

Renin und Angiotensin I-Converting
enzyme in Plasma und Niere
unter alpha-adrenerger Blockade
und nach Gabe eines Angiotensin
II-Antagonisten

Ludwig Woidy



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0030

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. med K. Thureau

Prof. Dr. med E. Gerlach

Prof. Dr. med G. ten Bruggencate

Renin und Angiotensin I-Converting enzyme in Plasma und
Niere unter alpha-adrenerger Blockade und nach Gabe eines
Angiotensin II-Antagonisten

D i s s e r t a t i o n

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ludwig Woidy

aus

Ergoldsbach

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: ..Prof..Dr..H..Dahlheim....

Mitberichterstatter: ..Prof..Dr..Dr..K..Thurau..
Prof. Dr. H. Holzgreve

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: ..Prof..Dr..W..Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung:..20.11.1986.....

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen

A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Methodik	12
I. Versuchsdurchführung	12
1. Vorbereitung der Ratten	12
2. Versuchsablauf	12
3. Herstellung des Nierenrindenhomogenats	14
II. Bestimmung der Plasma-Reninaktivität	16
III. Bestimmung der Reninkonzentration im Nierenrindenhomogenat	22
IV. Bestimmung der A I-Converting enzyme-Aktivität im Plasma	26
V. Bestimmung der A I-Converting enzyme-Aktivität im Nierenrindenhomogenat	29
VI. Bestimmung der Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin bei NaCl-reich und NaCl-arm ernährten Ratten	32
1. Catechol-o-Methyltransferase-Präparation	33
2. Durchführung der Katecholaminbestimmung	33
C. Ergebnisse	38
I. Blutdruck- und Herzfrequenzverhalten	38
II. Verhalten der Plasma-Reninaktivität	49
III. Verhalten der A I-Converting enzyme-Aktivität im Plasma	55
IV. Verhalten der Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin	61
V. Verhalten von Renin und A I-Converting enzyme in der Nierenrinde	65
VI. Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern	68
D. Diskussion	82
E. Zusammenfassung	103
F. Literatur	106

Verwendete Abkürzungen

A I	Angiotensin I
A II	Angiotensin II
BP	Blutdruck
CE	Angiotensin I-Converting enzyme
COMT	Catechol-o-Methyltransferase
HF	Herzfrequenz
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
INCEA	iso-Angiotensin I-Converting enzyme Aktivität in der Nierenrinde
NRC	Reninkonzentration in der Nierenrinde
PCEA	Angiotensin I-Converting enzyme Aktivität im Plasma
PRA	Reninaktivität im Plasma
RAS	Renin-Angiotensin-System
SAS	sympathiko-adrenerges System
ZNS	zentrales Nervensystem

A. EINLEITUNG

In Deutschland leiden ca. 20% aller Erwachsenen über 40 Jahre an einer behandlungsbedürftigen Hypertonie (43). In der Pathogenese des arteriellen Hochdrucks wird dem Renin-Angiotensin-System unter anderen eine entscheidende Rolle eingeräumt, und das nicht nur bei den renalen Formen dieser Krankheit, die ca. 10-15% aller Fälle ausmachen, sondern auch bei der häufigsten Form (80-85%), der primär essentiellen Hypertonie (39). So vertritt Irvine H. Page die Auffassung, daß "der zentrale Mechanismus der essentiellen, renovaskulären und malignen Hypertonie das Angiotensin sei" (65). Laragh empfiehlt eine Einteilung der essentiellen Hypertonie in solche mit hoher (5-15%), normaler (50-70%) und niedriger Plasma-Reninaktivität (15-30%) (85). Positive Behandlungsergebnisse der essentiellen Hypertonie mit Captopril, einem AI-Converting enzyme-Blocker (2), erfolgreiche Behandlung der hypertensiven Krise durch Blockade des RAS mit Saralasin oder Captopril (98), veränderte Parameter des intracerebralen RAS bei spontan hypertensiven Ratten (91), unterstreichen eine mögliche Beteiligung des RAS bei der Entstehung des Bluthochdrucks.

Die Entdeckung des Renin-Angiotensin-Systems geht auf das Jahr 1898 zurück, als Tigerstedt und Bergman die pressorische Wirkung eines Nierenextraktes nachwiesen. Die wirksame Substanz nannten sie zur Kennzeichnung ihrer Herkunft Renin (89). Der bedeutenste Synthesort sind die granulierten epitheloiden Zellen, die in der Media der afferenten Arteriole liegen. Renin steht am Anfang einer Reaktionskaskade. Es spaltet von dem hauptsächlich in der Leber synthetisierten Angiotensinogen (Reninsubstrat) das Peptid Angiotensin I ab. Von diesem Dekapeptid wird durch das Converting

enzyme das Dipeptid Histidyl-Leucin vom C-terminalen Ende her abgespalten und es entsteht das biologisch aktive Angiotensin II. Dieses Oktapeptid wird durch unspezifisch wirkende Peptidasen, den sogenannten Angiotensinasen, in kleinere Peptide und in eine biologisch wirksame Form, das Heptapeptid Angiotensin III, gespalten.

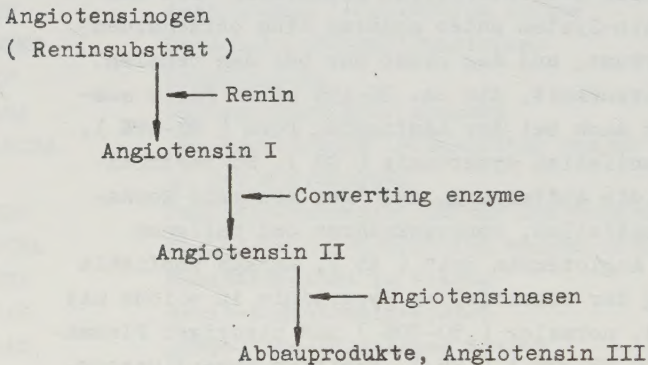


Abb. 1: Schematische Darstellung des Reaktionsablaufes im RAS

Zwischen dem RAS und dem sympathiko-adrenergen System wurden einige Beziehungen nachgewiesen, so 1. eine Beeinflussung der Reninfreisetzung durch das vegetative Nervensystem, 2. Einwirkungen der biologisch aktiven Komponente des RAS, des Angiotensin II, auf das autonome Nervensystem und 3. die Existenz eines eigenständigen zerebralen RAS, das unter anderem modulierend auf den zentral vegetativen "Output" einzuwirken vermag. Diese Punkte sollen im folgenden erläutert werden.

Regulation der Reninfreisetzung

Neben einem Einfluß des SAS auf die renale Reninfreisetzung werden 2 weitere Regulationsmechanismen diskutiert: die Macula densa-Theorie und die Barorezeptorentheorie.

Macula densa-Theorie:

Die tubuläre Natriumkonzentration im Bereich der Macula Densa soll an der Regulation der Reninfreisetzung beteiligt sein. Bei Mikropunktionsversuchen an Rattennieren fanden Thureau u. a. eine erhöhte Reninaktivität im juxtaglomerulären Bereich (86,87,88,), wenn die NaCl-Konzentration im distalen Tubulus zunahm. Die gesteigerte Reninaktivität soll eine lokal erhöhte Angiotensin II-Bildung induzieren. Durch das A II kommt es zu einer Konstriktion der afferenten Arteriole mit daraus folgender Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Umgekehrt wird aber auch behauptet, daß eine erniedrigte NaCl-Konzentration im distalen Tubulus zu einer erhöhten Reninfreisetzung führen soll (92).

Barorezeptorentheorie:

Diese Theorie stützt sich auf Untersuchungen von Tobian (90). Es wurde ein Druckrezeptor postuliert, der in der Gefäßwand der afferenten Arteriole liegen soll. Durch diesen Rezeptor kommt es bei Abnahme des renalen Perfusionsdruckes auf Grund der Änderung der Wandspannung zu einer vermehrten Reninfreisetzung.

Stimulation der Reninfreisetzung durch das SAS:

Erste Anhaltspunkte lieferten licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, wobei zahlreiche Nervenendigungen sowohl im Bereich der juxtaglomerulären Zellen als auch der Macula Densa gefunden wurden. Auf Grund fluoreszenztechnischer Untersuchungen konnten Monoamine in den Nervenendigungen an den granulierten Zellen der afferenten Arteriole nachgewiesen werden (5,8).

Infusionsversuche mit den beiden Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin erbrachten eine Stimulierung der Reninfreisetzung. Scornik und Paladini konnten durch intravenöse Noradrenalin-Infusion eine Erhöhung des Plasma-Angiotensinspiegels erreichen (92). Vander beobachtete bei intravenösen Noradrenalin- und Adrenalin-Infusionen unter

Konstanthaltung des renalen Perfusionsdruckes eine Erhöhung der PRA (93). Den gleichen Effekt erzielten Bunang (18) und Wathen (92) mit einer intrarenalen Noradrenalin-Infusion. Assaykeen und Mitarbeiter fanden unter Insulin-induzierter Hypoglykämie eine Erhöhung der PRA (5). Diese Steigerung der Reninfreisetzung führten sie auf die vermehrte Adrenalinfreisetzung aus dem Nebennierenmark unter Hypoglykämie zurück. Beim Phäochromocytom, einem Katecholamine produzierenden Tumor, wurde bei einigen Patienten ein erhöhter Plasma-Reninspiegel gemessen, während andere normale Reninaktivitäten hatten, ein Phänomen, das möglicherweise auf die bei dieser Krankheit zeitweilig exzessiv erhöhten Blutdruckwerte zurückgeführt werden kann (5).

Eine Reizung der Nierennerven, sei es direkt oder indirekt über eine Stimulierung intracerebraler Vasomotorenzentren oder reflektorisch, ferner Denervierungsversuche lieferten weitere Beweise für eine Kontrolle der Reninfreisetzung durch das autonome Nervensystem. Denervierung einer Niere führte zu einer Verminderung des renalen Reningehaltes beim Vergleich zum kontralateralen innervierten Organ (27). Vander (93) und Johnson (47) konnten durch direkte Reizung der Nierennerven die renale Reninfreisetzung stimulieren. Durch elektrische Reizung des Kreislaufzentrums in der Medulla oblongata führte Passo (67) eine erhöhte PRA herbei. Dieser Effekt war nach Denervierung der Nieren nicht mehr zu beobachten. Stimulation des lateralen Hypothalamus in Bereichen, die dem Abwehr und Fluchtverhalten zugeordnet werden, führte ebenfalls zu einer Zunahme der PRA (100), während eine Stimulation im medialen Hypothalamus den gegenteiligen Effekt zur Folge hatte (102). Für eine Beteiligung des SAS an der Reninfreisetzung spricht auch das Verhalten der PRA bei aktiver Orthostase, Stress, experimenteller Hämorrhagie und Karotisverschluß (18, 100, 30, 59). Alle diese Maßnahmen führen zu einer erhöhten

sympathischen Aktivität, und damit sowohl über Nierenner-
ven als auch über frei zirkulierende Katecholamine zu ein-
er erhöhten Reninfreisetzung. Hierbei scheint zumindest
teilweise auch das parasympathische Nervensystem beteiligt
zu sein. Afferenzen von postulierten Volumenrezeptoren im
cardiopulmonalen Gebiet, die im Vagus verlaufen, sollen ei-
nen hemmenden Einfluß auf den Sympathikus ausüben, Vago-
tomie führt zu einer verstärkten Reninfreisetzung, die
nach zusätzlicher Nierendenervierung nicht mehr zu beobach-
ten ist (44, 56, 101).

Anschließend wurde die Frage geklärt, welche Rezeptortypen
- Alpha- oder Beta-Rezeptoren- auf zellulärer Ebene bei der
neurohumoralen Impulsübertragung beteiligt sind. Spezifisch
agonistisch und antagonistisch wirkende Pharmaka sollten
zur Klärung dieser Frage beitragen. Wie zahlreiche Versuche
belegten, sind vornehmlich beta-adrenerge Mechanismen be-
teiligt (5, 59, 60, 68, 94, 100).

Während die Rolle der Beta-Rezeptoren für die Reninfrei-
setzung weitgehend anerkannt wird, herrschen über die Be-
teiligung der Alpha-Rezeptoren eher kontroverse Meinungen.
So konnten einige Autoren nach Applikation des Alpha-Re-
zeptorenblockers Phenoxybenzamin keinen signifikanten Ein-
fluß auf die Reninfreisetzung beobachten (4, 49, 68),
andere dagegen stellten eine erhöhte Reninsekretion fest
(48, 61, 66, 95). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse
von Blair (11, 12) und Winer (99), die nach Alpha-Rezep-
torenblockade eine inhibierende Wirkung auf die Reninfrei-
setzung fanden.

Im folgenden seien einige Mechanismen angeführt, durch deren
Vermittlung eine Einwirkung des vegetativen Nervensystems
auf die Reninfreisetzung denkbar ist:

(1) das SAS übt einen direkten Einfluß auf die Reninsekre-
tion an den juxtaglomerulären Zellen aus. Die Signalüber-
mittlung auf zellulärer Ebene erfolgt über Beta-Rezeptor-
en -eventuell auch Alpha-Rezeptoren- mit anschließender
c-AMP-Vermehrung und darauf folgender Reninfreisetzung

Im Renin-Angiotensin-System ist das Angiotensin II als die biologisch wirksamste Komponente zu betrachten. Für dieses Oktapeptid sind einige Interaktionen mit dem SAS beschrieben.

Die pressorische Wirkung von A II ist stärker, wenn es direkt in die Arteria vertebralis infundiert wird als bei peripherer Applikation. Es wird angenommen, daß dieser Effekt auf einer spezifischen Stimulation in der Area postrema beruht, da in diesem kaudalen Medulla oblongata-Bereich die Blut-Hirn-Schranke erhöht durchlässig ist. Als Folge dieser zentralen A II-Wirkung kommt es zu einer erhöhten efferenten sympathischen Aktivität (59). Peripher wirkt A II auf die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes und führt zu einer erhöhten Katecholaminausschüttung (69, 81). Es wirkt potenzierend auf die prä- und postsynaptische Übertragung sympathischer Erregungsimpulse, indem es die adrenerge Transmitterfreisetzung nach Nervenreizung fördert. Außerdem stimuliert es die Transmittersynthese und hemmt gleichzeitig die Noradrenalin-Wiederaufnahme in die adrenerge Variabilität. Es wird angenommen, daß das Oktapeptid auf postsynaptischer Seite die glatte Gefäßmuskulatur gegenüber Noradrenalin sensibilisiert (24, 59, 60, 103).

Der Nachweis der Komponenten des RAS -Renin, Angiotensinogen, Angiotensin I, Converting enzyme, Angiotensin II, Angiotensin II-Rezeptoren und Angiotensinasen- im zentralen Nervensystem führte zur Postulierung eines eigenständigen zerebralen RAS. Für diese Annahme sprechen auch Unterschiede der biochemischen Eigenschaften einiger RAS-Komponenten. So weist z.B. das Reninsubstrat einen höheren isoelektrischen Punkt auf als das im Plasma nachweisbare Angiotensinogen. Außerdem reagiert das RAS des Plasmas unter bestimmten Stimuli invers zu dem des Gehirns. Dem zerebralen RAS wird eine Bedeutung für die Pathogenese der Hypertonie beigemessen. Es wurde A II in Kerngebieten nachgewiesen, die bei der Blutdruckkontrolle beteiligt sind. Es

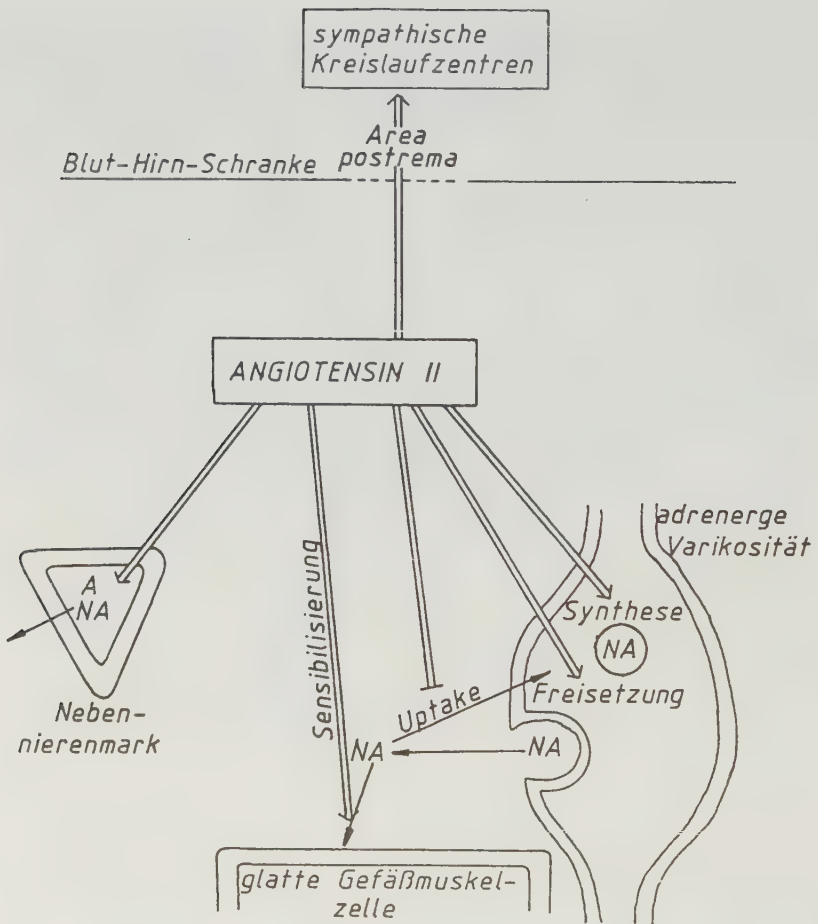


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen Angiotensin II und dem adrenergen sympathischen System
NA=Noradrenalin

$\Rightarrow$ =fördernde Wirkung, $\Rightarrow$ =hemmende W.

fanden sich ferner veränderte Aktivitäten des zentralen RAS bei Ratten mit genetisch bedingtem Hochdruck. Zudem konnte man eine erfolgreiche Blutdrucksenkung bei eben diesen Tieren

mit dem A II-Antagonisten Saralasin und Converting enzyme-Hemmern erreichen (16, 35, 36, 71, 72, 77, 91).

Bei der Bildung von A II ist neben dem Renin als ein weiteres wichtiges Enzym das Converting enzyme beteiligt. Dieses Enzym ist, wie von Erdös angenommen wird, identisch mit Kininase II, einem Bradykinin-abbauenden Enzym (31, 32). Die beiden Reaktionen ergänzen sich physiologisch sinnvoll in ihrer Wirkung, einmal durch Bildung des Vasokonstriktors A II, zum anderen durch Abbau des Vasodilators Bradykinin. Das CE ist ein in vielen Strukturen nachweisbares Enzym mit den höchsten Aktivitäten in Lunge, Hoden-Nebenhoden, Plasma und Niere. Versucht man sich über die physiologische Funktion des CE's klar zu werden, so ist zunächst die Frage zu beantworten, warum an der Bildung der biologisch wirksamen Komponente -A II- zwei Enzyme beteiligt sind. Zum Verständnis dieser Frage ist zu bedenken, daß das A I bereits biologische Wirkungen besitzt und nicht nur als Zwischenprodukt in der Synthese von A II zu verstehen ist. Es wurden für das A I derartige Wirkungen beschrieben, die sich zum Teil von denen des A II unterscheiden (69). Inwieweit diesen Wirkungen auch unter physiologischen Bedingungen eine Bedeutung zukommt, bedarf der weiteren Klärung. Es wäre ferner denkbar, daß durch das CE eine Feineinstellung der A II-Konzentration bewirkt wird mit dem Ziel überschüssige A II-Spiegel zu verhindern. Da angenommen wird, daß das CE identisch ist mit Kininase II, werden 2 Hormonsysteme über dieses Enzym gekoppelt.

Während für das Renin und A II Verknüpfungen mit dem SAS bereits nachgewiesen werden konnten, gibt es für das CE in dieser Hinsicht nur wenige Beobachtungen. Erste Hinweise lieferten Denervierungsversuche an der Niere. So gelang es durch Nierendennervierung einen Abfall der kortikalen und glomerulären Converting enzyme-Aktivität hervorzurufen (26). Bei Infusionsversuchen mit Dopamin konnte ein Anstieg der CEA im Plasma beobachtet werden (78).

Weitere Untersuchungen sind notwendig um eventuelle Zusammenhänge des SAS mit dem CE nachzuweisen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß für das CE mehrere iso-Enzyme nachgewiesen werden konnten. So gelang unserer Arbeitsgruppe der Nachweis eines solchen Enzyms in der Nierenrinde. Dieses Enzym unterscheidet sich von dem im Plasma enthaltenen CE durch folgende Parameter: es besitzt eine andere Michaelis-Menten-Konstante, ein unterschiedliches pH-Optimum und ein anderes Blockierungsverhalten. Ferner ist dessen Aktivität unabhängig von der NaCl-Konzentration des Inkubationsansatzes. (27, 28, 29). Dieses iso-Enzym ist nicht identisch mit einem weiteren, von Boucher (14) entdeckten iso-Enzym, das Tonin genannt wird. Es ist denkbar, daß das SAS unterschiedlich auf die verschiedenen Formen des CE's einwirken kann.

Für eine Beeinflussung der renalen Reninfreisetzung durch das vegetative Nervensystem gibt es bereits einige Untersuchungen und Erkenntnisse. Auch für die biologisch aktivste Komponente des RAS, das Angiotensin II, bestehen Hinweise, daß dieses Oktapeptid unter anderen auch Wirkungen auf das SAS ausübt. Weniger weiß man über eine mögliche Beeinflussung des CE's durch das SAS.

Das Ziel dieser Arbeit ist es das Verhalten von Renin und Converting enzyme unter Kontrollbedingungen, ferner nach veränderter Stimulationslage des SAS und außerdem nach zusätzlicher A II-Blockade mit Saralasin zu beobachten. Die Mobilisierung des SAS soll durch Infusion des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin in pressorisch wirksamer Dosis erreicht werden. Die Renin- und CE-Aktivitäten werden sowohl im Plasma als auch in der Niere bestimmt. Da es Hinweise für ein eigenständiges renales iso-CE gibt, soll diesem Enzym ein besonderes Interesse gelten.

Sämtliche Untersuchungen werden sowohl bei normal ernährten als auch diätetisch vorbehandelten (14 Tage NaCl-reiche Ernährung, 14 Tage NaCl-arme Ernährung) Ratten durchgeführt.

Bei der Ausarbeitung der Versuchsergebnisse soll darauf geachtet werden, ob zwischen den einzelnen Enzymen des RAS Abhängigkeiten bestehen und ob sich zwischen diesen Enzymen und Parametern des SAS (Blutdruck, Herzfrequenz, Katecholamine -diese wurden zusätzlich bei den diätetisch vorbehandelten Rattengruppen bestimmt-) Beziehungen finden lassen.

B. Methodik

I. Versuchsdurchführung

I.1. Vorbereitung der Ratten

Die Narkose der Ratten (Wistarstamm, männl. und weibl. Geschlecht, Körpergewicht: 170-320g) erfolgte mit Inaktin (110mg/kg KG., intraperitoneal). Nach medianen Halsschnitt wurde zuerst die Trachea freigelegt und katheterisiert. Anschließend haben wir die Arteria carotis communis links aufgesucht und präpariert. Nachdem die A. carotis communis nach distal abgebunden war, wurde eine Arteriotomie vorgenommen und herzwärts in dieses Gefäß ein Kunststoffkatheter eingelegt. Über diesen Katheter konnten wir mit Hilfe eines Statham Transducors mit angeschlossenem Druckverstärker (Fa. Hellige) den Blutdruck messen und kontinuierlich über einen angeschlossenen Schreiber aufzeichnen. Intermittierend wurde alle 5 Minuten die Herzfrequenz registriert. Ferner haben wir die Vena jugularis interna links präpariert und ebenfalls nach distaler Ligatur herzwärts katheterisiert. Über diesen Zugang erfolgte die Infusion der entsprechenden Lösungen.

I.2. Versuchsablauf

Um bei jedem einzelnen Tier entsprechende Kontrollwerte zu erhalten, wurde zunächst über eine Infusionspumpe mit einer Infusionsgeschwindigkeit von $30 \mu\text{l}/\text{min}$ physiologische Kochsalzlösung (0,9%) 15 Minuten lang infundiert (Vorinfusion). Nach dieser Kontrollperiode war aus dem Carotis-Katheter 0,3ml Blut zu entnehmen und das gleiche Volumen mit physiologischer Kochsalzlösung zu substituieren. Anschließend erhielten die Versuchstiere die ihrer Gruppe entsprechenden Infusionen.

Die Ratten wurden in 5 Gruppen aufgeteilt:

Gruppe 1: Kontrollgruppe (n=9)

Nach der Vorinfusion erhielten diese Tiere anschließend 45 Minuten lang nur physiologische Kochsalzlösung mit einer Geschwindigkeit von $30\mu\text{l}/\text{min}$, darauf erfolgte eine Blutentnahme von $0,3\text{ml}$ und die entsprechende Substitution des Volumens mit physiologischer NaCl-Lösung.

Gruppe 2: α -Blocker Phenoxybenzamin $1\text{mg}/\text{ml}$ (n=8)

Die Ratten dieser Gruppe erhielten anschließend nach der 15-minütigen NaCl-Infusion ($0,9\%$) den Alpha-Rezeptorenblocker Phenoxybenzamin in einer Konzentration von $1\text{mg}/\text{ml}$ physiologischer NaCl-Lösung mit einer Infusionsgeschwindigkeit von $30\mu\text{l}/\text{min}$ 45 Minuten lang (insgesamt: $1,35\text{ mg}$ Blocker / 45 min).

Gruppe 3: Saralasin ($30\mu\text{g}/\text{ml}$) und α -Blocker ($1\text{mg}/\text{ml}$) (n=7)

Nach 15-minütiger Infusion von $0,9\%$ NaCl-Lösung (Vorinfusion) und darauf folgender 15-minütiger Infusion von Saralasin ($30\mu\text{g}/\text{ml}$, $30\mu\text{l}/\text{min}$) wurde zusätzlich zum Saralasin der Alpha-Blocker Phenoxybenzamin mit einer Infusionsgeschwindigkeit von $30\mu\text{l}/\text{min}$ infundiert.

Gruppe 4: NaCl-reich ernährte Ratten: α -Blocker Phenoxybenzamin $1\text{mg}/\text{ml}$ (n=10)

Diese Tiere wurden 14 Tage lang vor Versuchsbeginn NaCl-reich ernährt. Die salzreiche Diät bestand aus 90% Altromin (C 1036) + 10% NaCl sowie physiologische NaCl-Lösung zum Trinken. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie bei Gruppe 2.

Gruppe 5: NaCl-arm ernährte Ratten: Saralasin ($30\mu\text{g}/\text{ml}$) und α -Blocker ($1\text{mg}/\text{ml}$) (n=8)

14 Tage vor Versuchsbeginn erhielten diese Tiere eine NaCl-arme Diät. Diese bestand aus NaCl-armen Altrominmehl und

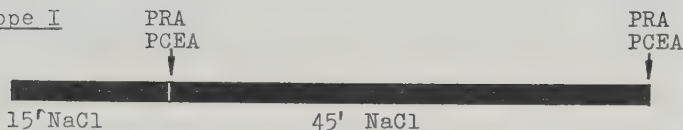
Aqua dest. zum Trinken. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie bei Gruppe 3.

I.3. Herstellung des Nierenrindenhomogenats

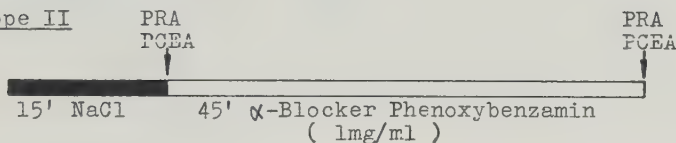
Nachdem der jeweilige Infusionsversuch beendet war, wurden ca. 10ml physiologische NaCl-Lösung in die Bauchaorta an der Aufzweigung in die beiden A. iliaca communes injiziert, um das Blut aus den Nieren zu spülen. Anschließend erfolgte die sofortige Durchtrennung der Aorta oberhalb der Nierenarterienabgänge. Die beiden Nieren wurden herausgenommen, entkapselt und in feine Scheiben (2-3mm dick) geschnitten und anschließend die Rinde vom Mark abgetrennt. 1g Nierenrinde wurde in 10ml physiologischer Kochsalzlösung für 3 x 1 Minute bei 1 Minute Pause mechanisch (nach Potter et Vehjem) homogenisiert und anschließend für 15 x 2 Sekunden bei 1 Sekunde Pause mit Ultraschall aufgeschlossen (MSE Ultraschallhomogenisator, Amplitude 6 Microns). Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 8050g wurde der Überstand dekantiert und dieser bei -80°C 3 x 15 Minuten lang eingefroren und 3 x bei 37°C aufgetaut. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter Eiskühlung. Anschließend wurde sofort die CEA gemessen, während die NRC erst später bestimmt wurde. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -80°C .

Die PCEA haben wir ebenfalls sofort nach Versuchsende bestimmt, während die Messung der PRA und der Katecholamine später durchgeführt wurde. Die Proben wurden dazu bei -80°C aufbewahrt.

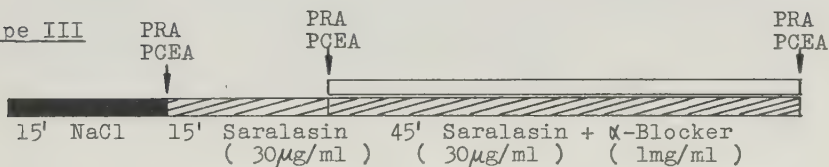
Gruppe I



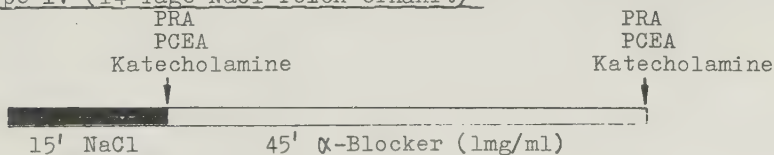
Gruppe II



Gruppe III



Gruppe IV (14 Tage NaCl-reich ernährt)



Gruppe V (14 Tage NaCl-arm ernährt)

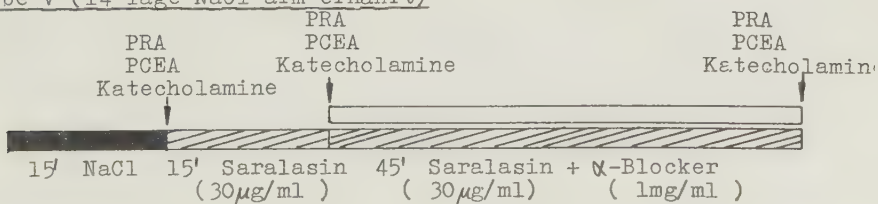


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes bei jeder einzelnen Versuchsgruppe
 Infusionsgeschwindigkeit: 30µl/min. Blutabnahme (0,3ml) durch Pfeil gekennzeichnet. Die im Blut bestimmten Parameter sind jeweils mit angegeben.

II. Bestimmung der Plasma-Reninaktivität (PRA)

Zur Messung der PRA diene der A I-Radioimmunoassay.

Dazu wird zu jeder Probe eine konstante Menge von radioaktiv markiertem (J^{125})-A I und eine konstante Menge A I-Antikörper zur Bindung des Peptids zugegeben. Das J^{125} -A I wird nun durch das in der Probe enthaltene A I mehr oder weniger stark vom Antikörper verdrängt. D.h. bei geringen A I-Gehalt der Probe wird wenig J^{125} -A I freigesetzt (es resultiert eine hohe Zählrate) und umgekehrt. Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen dem Antigen-Antikörper-Komplex und A I erfolgt bei $+4^{\circ}\text{C}$ und dauert ca. 20 - 24 Stunden. Um das freie A I abzutrennen, wird schließlich dem Gemisch mit Dextran beschichtete Aktivkohle zugesetzt, Diese wird nach ausgiebigen Schütteln abzentrifugiert, so daß die Radioaktivität im Überstand gemessen werden kann.

Herstellung der verwendeten Lösungen:

0,15M Phosphatpuffer pH=7,4

13,3493g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck)

1,8625g $\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Titriplex III) (Fa. Merck)

0,5g Rinderserumalbumin (Fa. Serva)

Die angegebenen Substanzen haben wir in 500ml Aqua bidest. gelöst und den pH-Wert unter Verwendung von HCl und NaOH auf 7,4 eingestellt.

Antikörper:

Die Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen A I (Fa. Bachem) gewonnen. Zur Titerbestimmung entnahmen wir jeweils 2ml Blut aus der Ohrvene, zentrifugierten es und haben das Plasma mit Phosphatpuffer pH=7,4 entsprechend weiterverdünnt. Abb. 5 zeigt die Bindungskapazität in Abhängigkeit von der jeweiligen Plasmaverdünnung nach verschiedenen langen Immunisierungszeiten. Wie aus Abb. 5 ersichtlich wird, sind ca. 12 Wochen nach

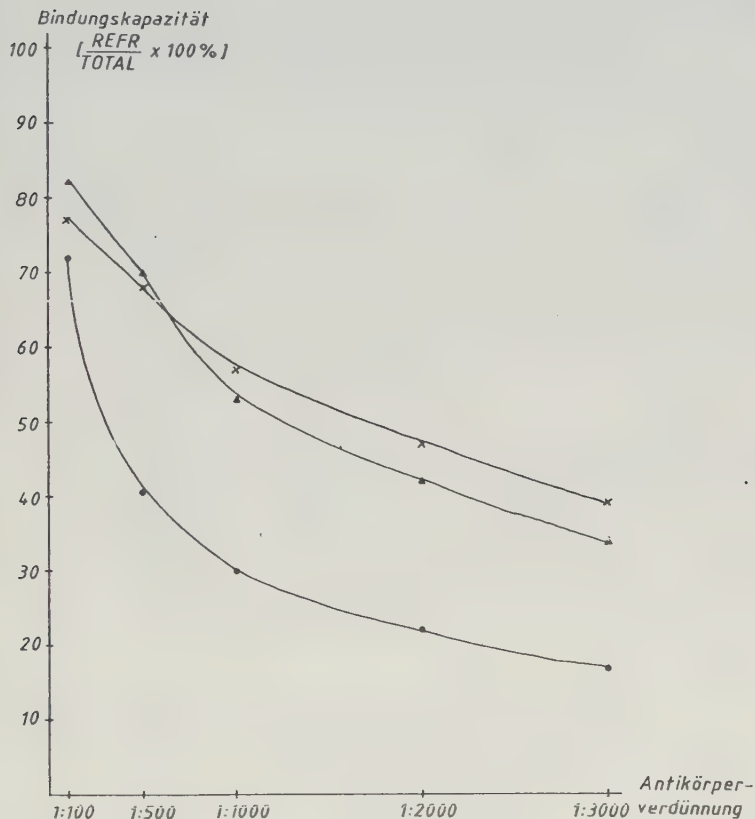


Abb. 5: Titerbestimmung von A I-Antikörpern im Plasma von Kaninchen nach unterschiedlich langen Immunisierungszeiten

(●—● = ca. 9 Wochen —, ×—× = ca. 12 Wochen —,
▲—▲ = ca. 15 Wochen nach Erstimmunisierung)

Erstimmunisierung die höchsten Antikörpertiter erreicht. Für den RIA wurde die Antikörperverdünnung 1:1000 gewählt, da bei niedrigerer Verdünnung im Plasma vorhandene Störfaktoren vermehrt zugesetzt werden, bei noch höherer Verdünnung andererseits die Bindungskapazität zu niedrig ist.

Kohlesuspension:

1g Aktivkohle-Dextran-Mixtur (10 Teile Kohle (Fa. Serva, Heidelberg) und 1 Teil Dextran T70) mußte mit Phosphatpuffer pH=7,4 auf 180ml suspendiert werden.

A I-Standard:

1mg synthetisches A I (Fa. Päsel, Frankfurt) wurde in 10ml Aqua bidest. gelöst und portioniert auf 100 μ l bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Zu jeder Messung haben wir jeweils 100 μ l mit RIA-Phosphatpuffer pH=7,4 weiterverdünnt (1000pg/100 μ l) und anschließend durch entsprechende Verdünnung eine Standardreihe hergestellt.

Mit Hilfe der Eichkurve konnte der unbekannte A I-Gehalt der Proben bestimmt werden. Um die Eichkurve zu linearisieren, wurde auf der Abszisse der Quotient aus der Zählrate des gesamt zugesetzten J¹²⁵-A I (TOTAL) zu der nach der jeweiligen A I-Zugabe gemessenen Zählrate und auf der Ordinate die zugegebene Menge an A I aufgetragen (siehe Abb. 6 und Abb. 7).

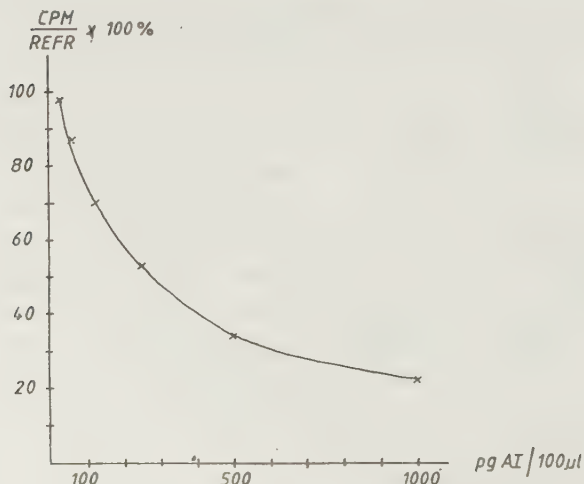


Abb. 6: Beispiel einer Eichkurve des RIA für die A I-Bestimmung

CPM=registrierte Zerfälle pro Minute

REFR=Bindungskapazität der zugesetzten A I-Antikörper

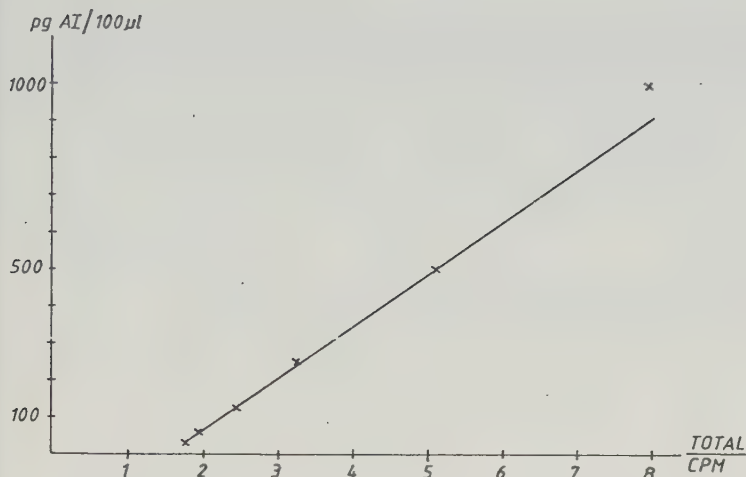


Abb. 7: Beispiel einer Eichkurve des RIA für die A I-Bestimmung -linearisiert (gleiche Meßwerte wie in Abb. 6)

TOTAL=Zählrate des gesamt zugesetzten J^{125} -A I
CPM=registrierte Zerfälle pro Minute

Ansatz eines A I-RIA für die Renin-Bestimmung:

	Background	TOTAL	REFR	Standard	Probe
0,15M Phosphatpuffer pH=7,4	1000µl	550µl	500µl	400µl	490µl
A I-Standard	-----	-----	-----	100µl	-----
Plasma-Probe	-----	-----	-----	-----	10µl
J^{125} -A I (Fa. IDW)	-----	50µl	50µl	50µl	50µl
Antikörper	-----	-----	50µl	50µl	50µl
ca. 20-24 Stunden bei +4°C inkubieren					
Dextran-Aktivkohle- Suspension	-----	-----	750µl	750µl	750µl

10 Minuten bei +4°C stehen lassen, zentrifugieren (10 Minuten bei 4100g und +4°C), Überstand dekantieren und messen der Radioaktivität (LKB Wallac, 1270 Rackgamma)

Für die Bestimmung der PRA wurde das Plasma bei 37°C in folgendem Ansatz inkubiert:

50 μ l 0,15M Phosphatpuffer pH=6,5

50 μ l Plasma

5 μ l Enzyminhibitorlösung

Zusammensetzung der Enzyminhibitorlösung:

Diese Lösung dient zur Blockierung von CE und Angiotensinasen.

2,0g EDTA $\cdot$ 2H₂O (Titriplex III) (Fa. Merck)

6,6g 8-Oxychinolinsulfat (Fa. Merck)

Beide Substanzen wurden in einem 100ml-Meßkolben mit ca. 80%-Isopropylalkohol unter gelindem Erwärmen (Wasserbad) vollständig gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,8ml BAL (2,3-Dimerkaptopropranolol-1) (Fa. Merck) und es wurde geschüttelt, bis eine klare, gelbe Lösung entstand. Das Restvolumen haben wir bis zur Eichmarke mit 20%-Isopropylalkohol aufgefüllt. Da die Enzyminhibitorlösung unbeständig ist, wurde sie jede Woche neu hergestellt.

Die Inkubationslösung mußte kalt im Eisbad angesetzt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C.

Um die Ermittlung der PRA als Endwertbestimmung durchführen zu können und um ferner zu prüfen, ob optimale Reaktionsbedingungen vorliegen (Substratsättigung, vollständige Enzymhemmung), wurde zunächst eine reaktionskinetische Messung durchgeführt. Dazu haben wir in kleinen zeitlichen Abständen jeweils 10 μ l aus dem Ansatz entnommen und in den RIA eingesetzt. Wie aus Abb. 8 ersichtlich wird, verläuft die Kinetik für eine Plasmaprobe aus Gruppe I (Kontrollgruppe, nur physiologische NaCl-Lösung infundiert) bis zu 60 Minuten linear, während der Anstieg der Kurve für eine mit Saralasin und Phenoxybenzamin behandelte Plasmaprobe wesentlich größer ist und die Kurve bereits nach 10 Minuten Inkubationszeit nicht mehr linear verläuft. Diese Abweichung von der Linearität läßt sich damit erklären, daß die Substrat-

konzentration nicht mehr im Sättigungsbereich liegt. Deswegen wurde die Ermittlung der PRA nicht als Endwertbestimmung, sondern als Kinetik durchgeführt. Es erfolgte eine Probenentnahme nach 0, 15, und 30 Minuten Inkubationsdauer für die mit Saralasin behandelten Plasmaproben, bzw. nach 0, 20 und 40 Minuten Inkubationsdauer für alle übrigen Proben.

Die so ermittelte, mittlere PRA für normal ernährte Ratten nach 15 Minuten 0,9% NaCl-Infusion (Infusionsgeschwindigkeit: $30 \mu\text{l}/\text{min}$) beträgt

$$62,8 \pm 23,5 \text{ ng/ml} \cdot \text{h} \quad (n=24)$$

VK: 37%

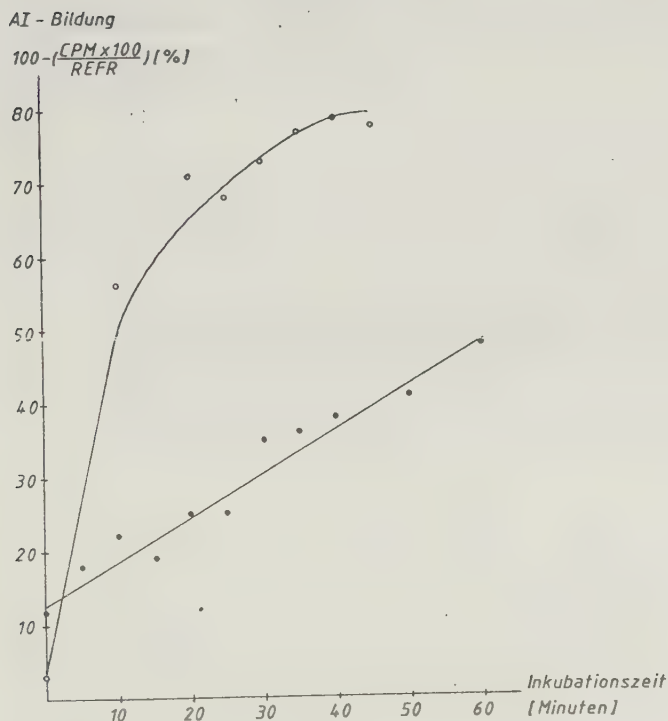


Abb. 8: Beispiel einer reaktionskinetischen Messung der PRA

- = Meßwerte einer Ratte aus Kontrollgruppe I
- = Meßwerte einer Ratte aus Gruppe III (Saralasin und Alpha-Blockade)

III. Bestimmung der Reninkonzentration im Nierenrindenhomogenat

Die Ermittlung der Reninkonzentration im Nierenrindenhomogenat erfolgte ebenfalls radioimmunologisch. Um ein Maß für die Reninkonzentration zu erhalten muß Substratsättigung gewährleistet sein. Denn erst dann kann die A I-Bildung als Maß des Reningehaltes der Probe betrachtet werden.

Der Inkubationsansatz für die Reninkonzentrationsmessung im Nierenrindenhomogenat setzte sich wie folgt zusammen:

50 μ l Homogenatextrakt (1:80 verdünnt mit Phosphatpuffer pH=6,5)

100 μ l Rattenreninsubstrat (ca 340ng/ml, im RIA ermittelt gewonnen aus Rattenplasma von 24Std. nephrektomierten Ratten)

20 μ l Enzyminhibitorlösung

Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert, darauf 4 Minuten lang auf 100°C gebracht und anschließend 2 Minuten bei 8050g zentrifugiert. Aus dem Ansatz wurden 50 (bzw. 25) μ l im RIA eingesetzt.

Der pH des Inkubationsgemisches wurde jeweils kontrolliert und mit 1N NaOH auf pH=6,5 eingestellt, dem Optimum der A I-Bildung (25). Im Gegensatz zu früheren Messungen unserer Arbeitsgruppe setzten wir nur die Hälfte des Probenvolumens ein, da der Reninsubstratgehalt mit 340ng/ml relativ niedrig ist. Durch dieses Vorgehen ließ sich die Substratkonzentration um den Faktor 1,4 erhöhen.

Auch hier mußte zunächst eine Reaktionskinetik mit unverdünnt eingesetzten Homogenatextrakt durchgeführt werden. Die Abb. 9 zeigt das Ergebnis einer solchen Kinetik. Dabei ergab sich ein kontinuierlicher Abfall des A I-Gehaltes der Probe mit zunehmender Inkubationszeit. Wahrscheinlich beruht dies auf einen hohen Gehalt an A I-abbauenden Enzymen. Dieses Problem konnte durch weitere Verdünnung des Homogenat-

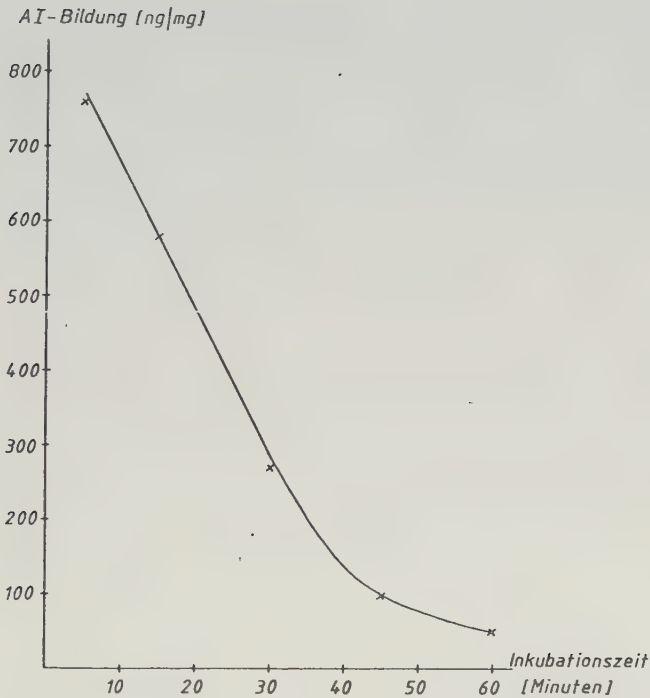


Abb. 9: Reaktionskinetische Messung der Reninkonzentration im Nierenrindenhomogenat bei unverdünnter Probe
Meßwerte einer Ratte aus Gruppe IV (14Tg. NaCl-reich ernährt, Alpha-Rezeptorenblockade)
Inkubationsgemisch: 100 μ l Homogenat, 100 μ l Substrat, 20 μ l Enzymhemmer

extraktes umgangen werden. Es zeigte sich dabei, daß erst ab einer Verdünnung von 1:80 eine lineare A I-Bildung beobachtet werden konnte (Abb. 10). Diese Linearität reicht für einen Homogenatextrakt mit niedrigem Reningehalt -wie er bei NaCl-reich ernährten Tieren zu erwarten war- bis zu einer Inkubationszeit von 60 Minuten, während sie für NaCl-arm ernährte Tiere nur bis zu 30 Minuten beobachtet wurde, worauf ein Knick in der Kurve folgte.

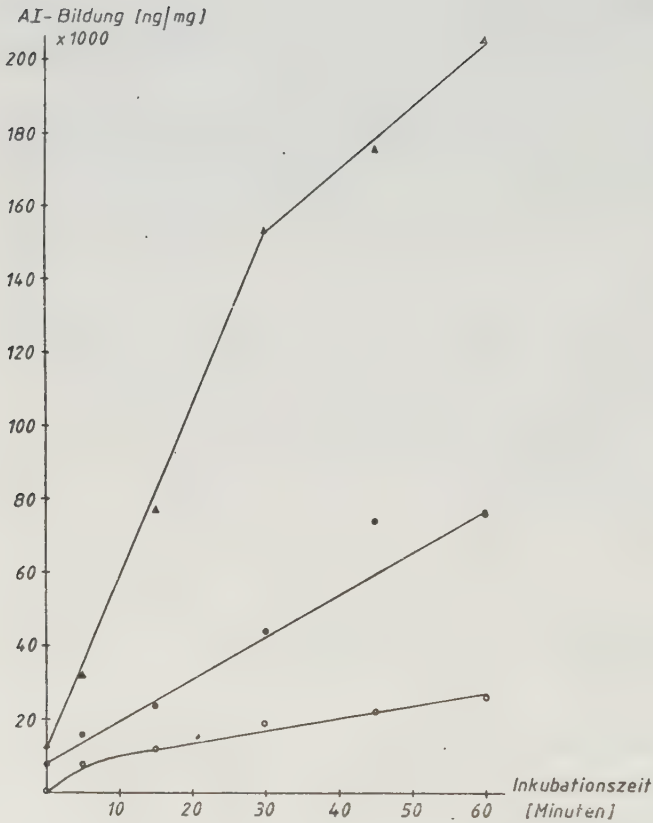


Abb. 10: Reaktionskinetische Messung der Reninkonzentration im Nierenrindenhomogenat bei unterschiedlich verdünnter Probe

▲—▲= Meßwerte einer Ratte aus Gruppe V (14Tg. NaCl-arm ernährt, Saralasin + Phenoxybenzamin), Homogenat 1:80 verdünnt

●—●= Meßwerte einer Ratte aus Gruppe IV (14Tg. NaCl-reich ernährt, Phenoxybenzamin), Homogenat 1:40 verdünnt

Meßwerte derselben Ratte aus Gruppe IV, Homogenat 1:80 verdünnt (●—●)

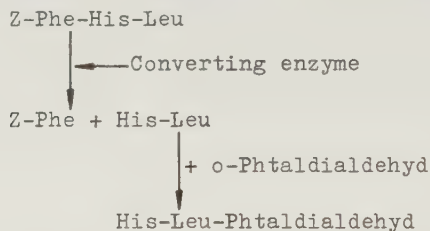
Inkubationsgemisch: 50µl Homogenatextrakt, 100µl Reninsubstrat, 20µl Enzymhemmer

Um eine Endwertbestimmung der Reninkonzentration sicher im linearen Teil der Kurve durchführen zu können, wählten wir eine Inkubationsdauer von 15 Minuten. Ferner wurde bei den NaCl-arm ernährten Tieren aus Gruppe V nur 25 μ l des Inkubationsgemisches in den RIA eingesetzt, um mit dem im Probenvolumen enthaltenen A I-Gehalt noch auf der Eichkurve des RIA (50-1000pg A I/ml) zu liegen. Bei allen übrigen Proben wurden 50 μ l für den RIA verwendet.

IV. Bestimmung der Plasma-Converting enzyme-Aktivität (PCEA)

Die Ermittlung der PCEA erfolgte modifiziert nach der Methode von Piquilloud, Reinhartz und Roth (73).

Dabei werden in einer ersten Inkubation von dem synthetischen Substrat Benzyloxycarbonyl-Phe-His-Leu (Z-Phe-His-Leu, Fa. Bachem, Kalifornien) das entstehende Dipeptid Histidin-Leucin abgespalten. Die Geschwindigkeit der His-Leu-Bildung dient als Maß für die Aktivität des Enzyms. Das His-Leu reagiert in einer zweiten Inkubationsphase mit zugegebenen O-Phtaldialdehyd zu einer Komplexverbindung, die fluorimetrisch bei 500nm (Anregung bei 365nm) bestimmt wird.



Herstellung des verwendeten Borax-Phosphatpuffers:

(0,05M Borax, 0,1M KH_2PO_4)

10,061g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ und 10g NaCl wurden in 1000ml Aqua bidest. gelöst. Ferner wurden 13,609g KH_2PO_4 und 10g NaCl ebenfalls in 1000ml Aqua bidest. gelöst. Um einen Borax-Phosphat-P. mit einem pH=8,0 zu erhalten, mußten 20ml $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7^-$ und 16ml KH_2PO_4 -Lösung miteinander vermischt werden. Für einen Borax-Phosphat-Puffer mit pH=6,0 haben wir 20ml $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7^-$ und 96ml KH_2PO_4 -Lösung miteinander vermengt.

Das Inkubationsvolumen setzte sich aus 500 μ l Borax-Phosphat-Puffer pH=8,0, 25 μ l Z-Phe-His-Leu (2mg/ml Methanol) und 10 μ l der zu testenden Probe zusammen. Das Plasma wurde vorher 1:50 mit Borax-Phosphat-Puffer pH=8,0 verdünnt.

500 μ l Borax-Phosphat-Puffer pH=8,0

25 μ l Substrat

10 μ l Plasmaprobe (1:50 verdünnt)

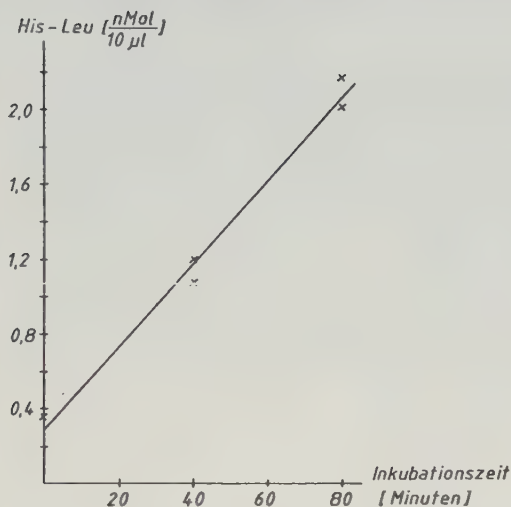


Abb. 11: Beispiel einer reaktionskinetischen Messung der PCEA

Inkubationsansatz: siehe oben

Nach einer Inkubationsdauer von 0, 40 und 80 Minuten bei 37°C mußten die Proben sofort in Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 4N NaOH gestoppt werden. Anschließend haben wir 25 µl o-Phtaldialdehyd (2mg/ml Methanol) zugegeben und zur Bildung des His-Leu-Phtaldialdehydkomplexes 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Durch weitere Zugabe von 50 µl 12N HCl wurde die Reaktion gestoppt. Nach einer zur Stabilisierung erforderlichen Wartezeit von ca. 30 Minuten haben wir den entstandenen His-Leu-Phtaldialdehyd-Komplex fluorimetrisch mit Hilfe eines Spektralphotometers der Fa. Zeiss (PMQ II) gemessen.

Die so ermittelten Werte ließen sich mit einer zu jeder Bestimmung aufgenommenen Eichkurve in µMol/ml·h umrechnen. Für die Eichung verwendeten wir eine Lösung des Dipeptids His-Leu (Fa. Bachem, Kalifornien) in einer Konzentration

von 7mg/100ml 20% Isopropylalkohol. Von dieser Stammlösung wurden unterschiedliche Volumen zur Ermittlung der Eichkurve eingesetzt.

Die Bestimmung der PCEA erfolgte reaktionskinetisch bei 0, 40 und 80 Minuten Inkubationsdauer. Die Steigung der Geraden dient dabei als Maß der Enzymaktivität. Abb. 11 zeigt das Ergebnis einer solchen Kinetik. Bei der mehrfachen Bestimmung einer Plasmaprobe (Intraassay) betrug der Variationskoeffizient 10%.

Die so ermittelte, mittlere PCEA normal ernährter Ratten nach 15 Minuten Infusion von 0,9% NaCl-Lösung (Infusionsgeschwindigkeit: 30 μ l/min) beträgt

$$9,9 \pm 3,4 \mu\text{Mol/ml} \cdot \text{h} \quad (n=24)$$

$$\text{VK: } 34,8\%$$

V. Bestimmung der Converting enzyme-Aktivität im Nierenrindenhomogenat

Die Bestimmung der CEA im Nierenrindenhomogenat erfolgte nach derselben Methodik wie die des Plasmas. Da aber aus früheren Messungen unserer Arbeitsgruppe bekannt ist (27, 28, 84), daß in der Nierenrinde und insbesondere im glomerulären Bereich ein Iso-CE enthalten ist mit einem z.B. anderem pH-Optimum ($\text{pH}=6,0$), wurde als pH des Inkubationsansatzes $\text{pH}=6,0$ (Borax-Phosphat-Puffer $\text{pH}=6,0$) eingestellt. Bei einigen Homogenatextrakten wurde zusätzlich die CEA auch bei $\text{pH}=8,0$ (pH -Optimum des Plasma-CE) ermittelt. In Übereinstimmung mit unseren früheren Ergebnissen ergibt sich bei $\text{pH}=6,0$ eine wesentlich höhere Aktivität für das Nierenrinden-CE als bei $\text{pH}=8,0$.

Das Homogenat wurde vor der Zugabe in das Inkubationsgemisch noch 1:10' mit Borax-Phosphat-Puffer $\text{pH}=6,0$ (bzw. $\text{pH}=8,0$) verdünnt. Die Gewinnung des Homogenats erfolgte wie unter B.I.3 beschrieben.

Im Laufe der Zeit haben wir den Homogenisationsaufschluß der Nierenrinde weiter optimiert. Es konnten nämlich höhere Werte für die CEA gemessen werden, wenn das Homogenat vor der Zentrifugation 3 x 15 Minuten lang bei -80°C eingefroren und 3 x 15 Minuten bei 37°C wieder aufgetaut wurde. Wahrscheinlich wird durch dieses Vorgehen ein weiterer Zellaufschluß bewirkt. (siehe Abb. 13). Es wurde jedoch die Präparation der Nierenrinde, wie unter B.I.3 beschrieben, beibehalten um vergleichbare Werte zu erhalten.

Bei der Bestimmung einer Homogenatprobe in mehreren Meßreihen (Intraassay) ergab sich ein Variationskoeffizient von 3,4%.

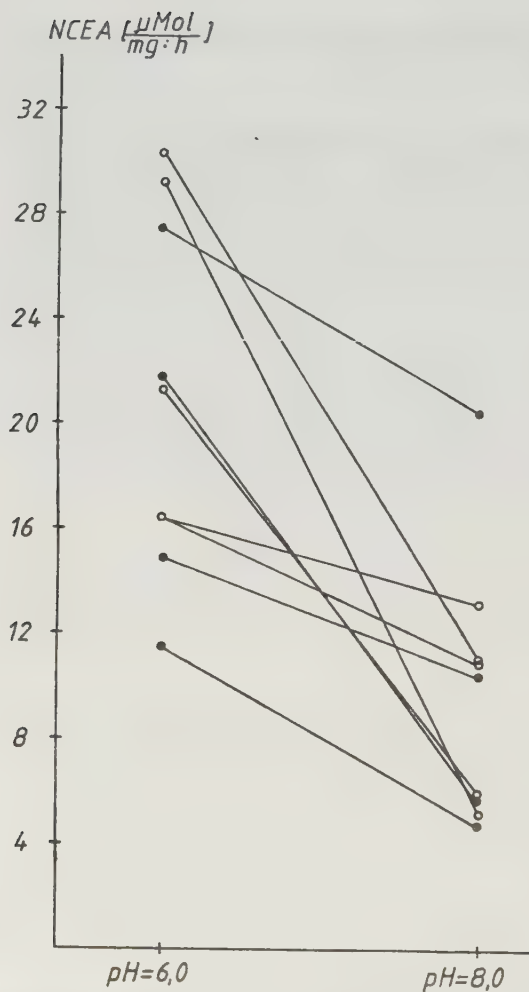


Abb. 12: Abhängigkeit der CEA in Nierenrindenhomogenaten vom pH des Inkubationsansatzes

- — ● Kontrollgruppe I (0,9%NaCl-Lösung infundiert)
- — ○ Gruppe III (Saralasin und Phenoxybenzamin infundiert, normal ernährte Ratten)

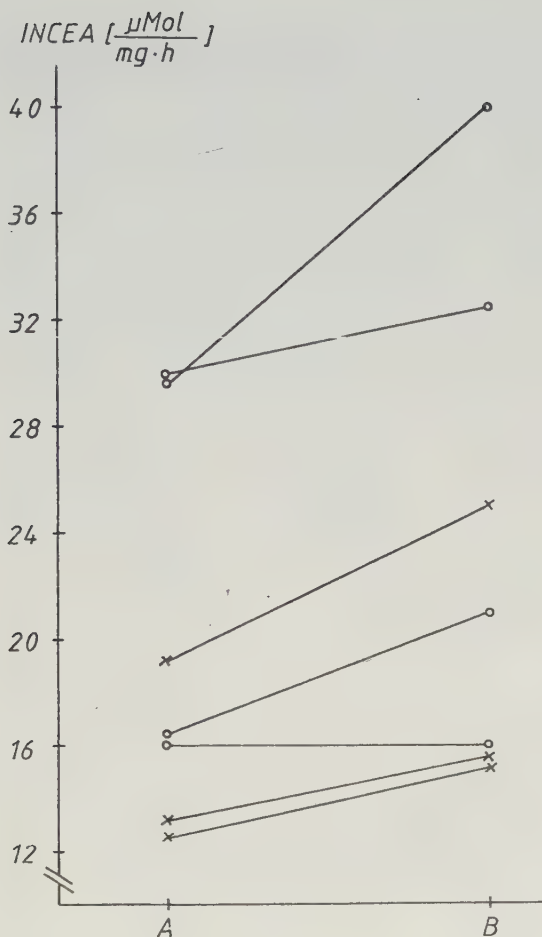


Abb. 13: Abhängigkeit der renalen Iso-CEA von der Herstellung des Nierenrindenhomogenats

A=Homogenat vor dem Einfrieren zentrifugiert

B=Homogenat nach dem Einfrieren zentrifugiert

○—○ Gruppe III (Serolasin und Phenoxybenzamin infundiert, normal ernährte Ratten)

x—x Gruppe IV (Phenoxybenzamin infundiert, NaCl-reich ernährte Ratten)

Inkubations-pH: 6,0

VI. Bestimmung der Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin bei NaCl-reich und NaCl-arm ernährten Ratten

Die Bestimmung erfolgte radioenzymatisch (REA) nach der Methode von M. DaPrada und G. Zürcher (75).

Prinzip der Messung: Mit Hilfe des Enzyms Catechol-o-Methyl-Transferase (COMT) werden die Katecholamine methyliert. Die radioaktiv markierte Methylgruppe wird dabei von dem Substrat ^3H -S-Adenosyl-Methionin übertragen. Nach Extraktion der Derivate erfolgt eine weitere Auftrennung mittels Dünnschicht-chromatographie.

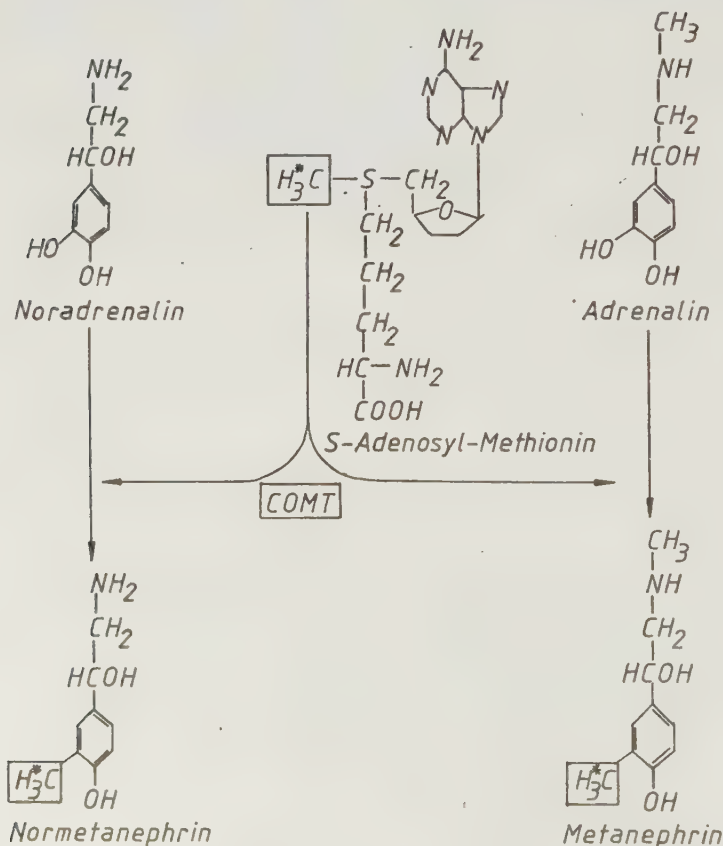


Abb. 14: Reaktionsschema für die Bestimmung der Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin

VI. 1. COMT-Präparation

Die COMT-Präparation erfolgte modifiziert (75) nach der Methodik von Axelrod und Tomchick (7) aus Rattenleber. Nach Inaktin-Narkose (110mg/kg KG) wurde 5 Tieren die Leber entnommen (Gesamtgewicht ca. 46g) und diese in 4 Vol.% einer isotonen KCl-Lösung homogenisiert (Potter El Vehjem). Dazu zerkleinerten wir das Gewebe mechanisch in einem Haushaltsmixer und homogenisierten es anschließend 3 x 1 Minute mit jeweils 1 Minute Pause in einem Potter El Vehjem-Homogenisator. Darauf erfolgte eine Zentrifugation bei 4000G für 10 Minuten (Beckmann C-2-Ultrazentrifuge). Der Überstand (pH=6,75) mußte mit 1M Essigsäure auf pH=5,0 eingestellt werden. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten war eine erneute Zentrifugation 10 Minuten lang durchzuführen (MSE High Speed 18 bei ca. 15000 RPM). Zu 300ml des Überstandes wurde 52g Ammoniumsulfat zugegeben und anschließend 10 Minuten zentrifugiert (MSE High Speed 18 bei 15000 RPM), darauf zum Überstand 34g Ammoniumsulfat zugesetzt und erneut zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 50ml 1mM Na-Phosphat-Puffer (pH=7,0) gelöst. Es stellte sich ein pH von 5,5 ein. Anschließend haben wir für 24 Stunden gegen 1mM Na-Phosphat-Puffer (pH=7,0), dem Dithiothreitol (0,1mM) zugesetzt war, dialysiert. Nun wurde erneut zentrifugiert und die überstehende Enzymlösung (pH=5,55) im REA eingesetzt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter Eiskühlung. Die Enzymlösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

VI. 2. Durchführung des Assay

Vorkereitung der Plasmaproben:

Das Plasma mußte vor dem Einsatz in den Assay enteiweißt werden mit 0,6 N Perchlorsäure im Volumenverhältnis 1:1. Um die Aktivität des Enzyms (COMT) zu erhöhen, wurden der Perchlorsäure 0,2% EGTA (=Titrplex VI) und 0,02% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

zugegeben.

Die als externer Standard verwendeten Lösungen (Suprarenin, Arterenol, Fa.Hoechst) waren mit 0,01N HCl zu verdünnen. Als Leerwert verwendeten wir oxydiertes Plasma. Dazu wurden 2mg NaJO₄ zu 1ml Plasma gegeben, 10 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend -wie oben beschrieben- enteweißt.

Zusammensetzung des Inkubationsvolumens:

<u>Plasmaprobe</u>	<u>Standard</u>
0,1mg Dithiothreitol	
50µl Tris-HCl-Puffer 2M pH=9,6	
20µl MgCl 25mM	
25µl COMT-Enzymlösung	
5µl ³ H-SAM (Fa. NEN, spez. Aktivität: 13Ci/mMol)	
100µl	
+ 100µl Plasma (enteweißt)	+ 100µl 0,3N HClO ₄
+ 50µl 0,01N HCl	+ 50µl Standardlösung
250µl	250µl
(pH=8,25-8,30)	
Inkubation: 60min bei 37°C	
Beendigung der Inkubation: Abkühlung der Proben auf 0°C	
Zugabe: + 150µl Borat-Puffer 1M (pH=8,0)	
Gesamtvolumen: 400µl	

Extraktion:

Zu den Proben mit jeweils 400µl Volumen wurden zugegeben 50µl 1,5% Na-TPB-Lösung und 50µl einer Lösung, die die methylierten Katecholamine Metanephrin und Normetanephrin (Fa. Sigma, 0,5mg/ml 0,01N HCl) enthielt. Nun konnten die Katecholamine in 10ml Diethyl-Ether extrahiert werden. Darauf wurde 5 Minuten geschüttelt und anschließend zentrifugiert (2min lang bei 2290g). Eine bessere Trennung der Phasen ließ sich durch Abkühlung der Wasserphase im Trockeneis-Ethanol-Bad für 20 Sekunden erreichen. Die organische

Phase wurde zu 0,5ml 0,1N HCl hinzugegeben. Nach Schütteln, zentrifugieren und schnellgefrieren (wie oben beschrieben) konnte die organische Phase verworfen werden. Darauf erfolgte die Zugabe von 5ml n-Butylacetat (mit H_2O gesättigt) zur wässrigen Phase, anschließend wurde die organische Phase verworfen und die Wasserphase gefrieretrocknet.

Dünnschichtchromatographie:

(Kieselgel 60F₂₅₄, Dicke: 0,2mm, Fa. Merck)

Die gefrieretrockneten Proben wurden in 80 μ l einer Lösung, bestehend aus Methanol:0,001N HCl im Verhältnis 4:1, gelöst, auf die Chromatographieplatte aufgetragen, und diese anschließend ca. 25 Minuten mit folgend angegebenen Fließmittel (42ml) behandelt: Chloroform:Ethanol:Ethylamin 70% (16:3:2). Wir trockneten die Platten unter einem warmen Luftstrom und lokalisierten die Banden unter einem UV-Strahler.

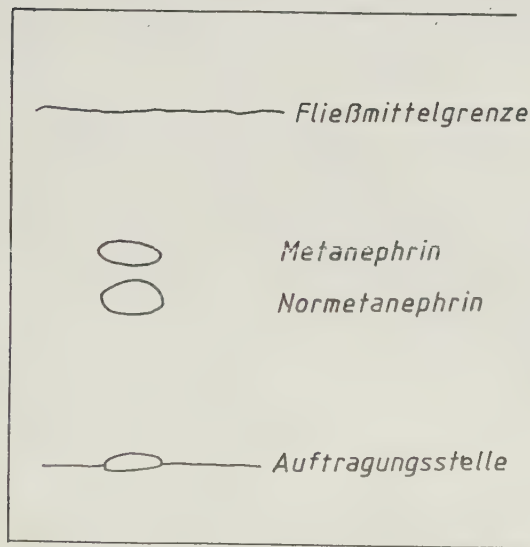


Abb. 15: Ergebnis einer entwickelten Chromatographieplatte
Rf-Werte (gemittelt: n=4): Metanephrin: 0,58
Normetanephrin: 0,46

Weitere Behandlung der abgetrennten Banden:

Die Adrenalin und Noradrenalin enthaltenden Banden wurden von der Platte abgekratzt und in 1ml 2N NH_3 gelöst. Darauf mußte die Lösung geschüttelt und zentrifugiert werden. Nach Dekantierung des Überstandes war das Präzipitat noch einmal -wie eben beschrieben- zu behandeln. Nach Zugabe von 0,25ml 3% NaJO_4 erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 37°C . Anschließend wurden die Proben in Eis gestellt und mit je 0,5ml 10N Essigsäure und 10ml Toluol versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Davon mußten 9,7ml organische Phase zu 10ml 0,5% Butyl-PBD (gelöst in Toluol) gegeben werden. Jetzt erfolgte die Messung der Radioaktivität in einem Beckman 100 Liquid-Scintillation-Counter 10 Minuten lang. Abb. 16 zeigt Standardkurven für die beiden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin.

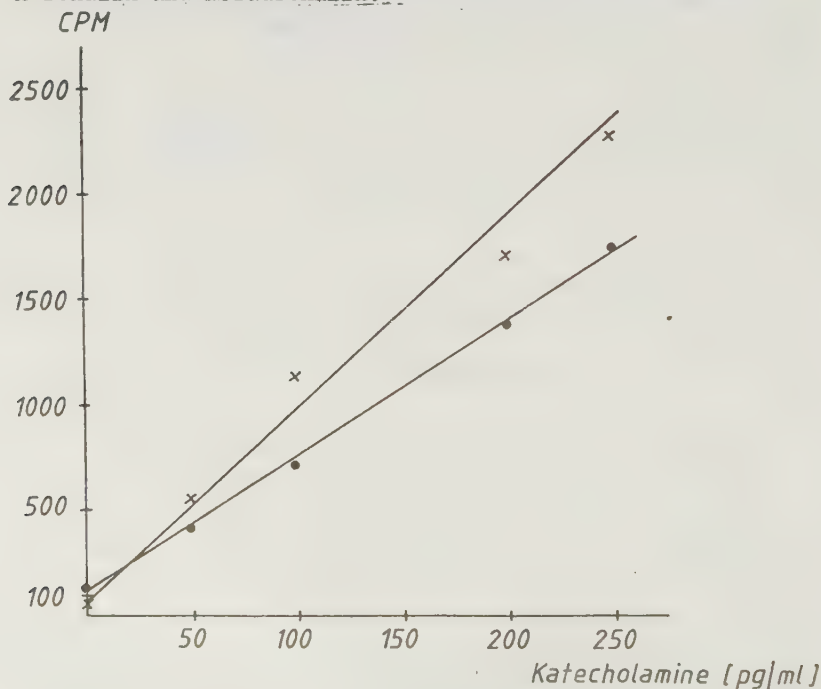


Abb. 16: Beispiel von Standardkurven zur Bestimmung der Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin

CPM=registrierte Zerfälle pro Minute

● = Adrenalin

x = Noradrenalin

Die Proben verdünnten wir nach dem Enteiweißen im Verhältnis 1:1 mit 0,3N HClO_4 . Die mittleren Plasmaspiegel für die beiden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin nach 15 Minuten NaCl-Infusion sind aus Tabelle I ersichtlich

	Noradrenalin	Adrenalin
NaCl-arm ernährt, Gruppe V (n=8)	2013 $\pm$ 1619	688 $\pm$ 1355
NaCl-reich ernährt, Gruppe IV (n=8)	2225 $\pm$ 924	1356 $\pm$ 1482

Tabelle I: Mittlere Noradrenalin-, bzw. Adrenalin-Plasmakonzentrationen mit Standardabweichungen (in pg/ml) bei NaCl-arm und NaCl-reich ernährten Tieren nach 15 Minuten NaCl-Infusion (Inf.-Geschwindigkeit: 30 $\mu\text{l/min}$)

C. ERGEBNISSE

I. Blutdruck- und Herzfrequenzverhalten

Während eines Infusionsversuches wurden kontinuierlich mittels eines Druckaufnehmers mit Druckverstärker und angeschlossenem Direktschreiber der Blutdruck und intermittierend alle 5 Minuten die Herzfrequenz registriert. Die Blutdruckwerte beziehen sich jeweils auf Messungen in der A. carotis communis links.

Mittlerer Blutdruck, bzw. mittlere Herzfrequenz nach Infusion von 0,9% NaCl-Lösung (15 Minuten lang) von normal ernährten, unbehandelten Ratten:

Blutdruck syst.:	$124 \pm 20,5$ mmHg	
	VK: 16,5%	n=23
diast.:	$110 \pm 21,5$ mmHg	
	VK: 15,4%	n=23
Herzfrequenz:	353 ± 54 min ⁻¹	
	VK: 15,4%	n=23

Mittlerer Blutdruck, bzw. mittlere Herzfrequenz nach Infusion von 0,9% NaCl-Lösung (15 Minuten lang) von 14 Tage NaCl-reich, bzw. 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten:

	NaCl-reich (n=10)	NaCl-arm (n=8)
Blutdruck syst.:	$130 \pm 10,1$ mmHg	$120 \pm 14,4$ mmHg
	VK: 8%	VK: 12%
diast.:	$112 \pm 12,6$ mmHg	$99 \pm 15,8$ mmHg
	VK: 11%	VK: 16%
Herzfrequenz:	390 ± 32 min ⁻¹	368 ± 17 min ⁻¹
	VK: 8%	VK: 5%

Die statistische Auswertung erfolgte für verbundene Stichproben mit dem Student-t-Test, für unverbundene mit dem U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whithney.

Die Herzfrequenz der NaCl-reich ernährten Ratten liegt nach der Infusion von 0,9% NaCl-Lösung (15 Minuten lang) statistisch

auffällig ($2p \leq 0,05$) höher als bei den normal ernährten Ratten. Alle übrigen Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

Die Abb. 17 zeigt exemplarisch das Blutdruck- und Herzfrequenzverhalten an einer Ratte der Gruppe I während einer 60 minütigen Infusion mit 0,9% NaCl-Lösung.

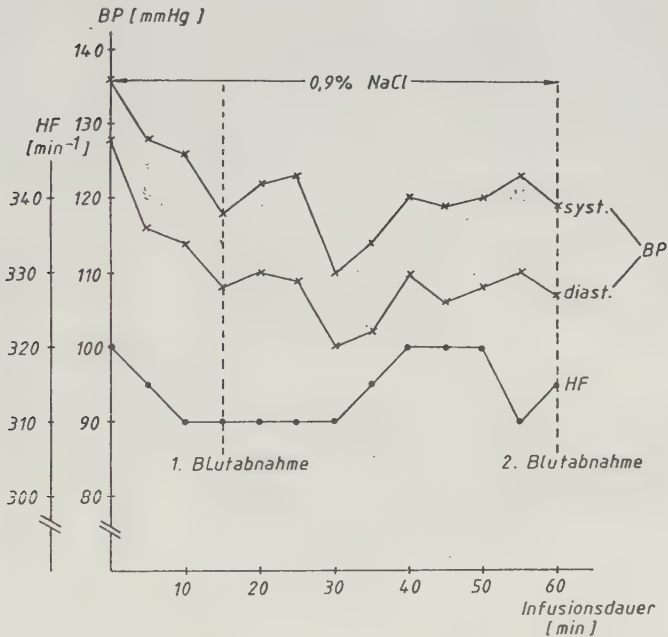


Abb. 17: Blutdruck- und Herzfrequenzverhalten einer normal ernährten Ratte (♀, 360g) während einer Infusion mit physiologischer (0,9%) NaCl-Lösung
Infusionsgeschwindigkeit: $30 \mu\text{l}/\text{min}$
Ordinate: BP=Blutdruck, HF=Herzfrequenz

In Abb. 18 ist ein Beispiel aus Gruppe II für einen Infusionsversuch mit dem α -Rezeptorenblocker Phenoxybenzamin wiedergegeben.

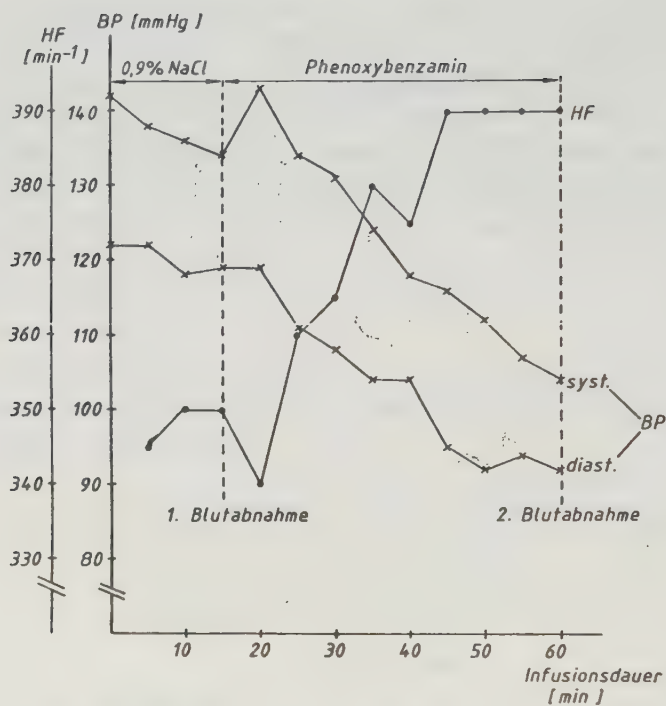


Abb. 18: Blutdruck- und Herzfrequenzverhalten einer normal ernährten Ratte (♀, 230g) während α -Blockade mit Phenoxybenzamin (1mg/ml)

Infusionsgeschwindigkeit: 30 μ l/min

Ordinate: BP=Blutdruck, HF=Herzfrequenz

In Tabelle II sind die gemittelten Blutdruckwerte und in Tabelle III die gemittelten Herzfrequenzen für die einzelnen Versuchsgruppen zusammengestellt. Zusätzlich angegeben sind jeweils die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten. Abb. 19 und Abb. 20 enthalten dieselben Ergebnisse graphisch dargestellt. Die statistisch signifikanten Befunde sind mit vermerkt.

Die gemittelten Blutdruckwerte der Gruppen II, IV und V nach 15 Minuten 0,9% NaCl-Infusion unterscheiden sich nicht

BLUTDRUCK (syst./diast.) (mmHg)	Kontrolle				Phenoxybenz.- + Saralasin- Inf.		Phenoxybenz.- + Saralasin- Inf.		Phenoxybenz.- + Saralasin- Inf.	
	Gruppe I n=8	Gruppe II n=8	Gruppe III n=7	Gruppe IV n=10	Gruppe V n=8					
nach 15' NaCl-Inf. + 45' NaCl-Inf.	109/97 +21,3/25,6 VK: 20%/26%	123/109 +12,2/13,4 VK: 10%/12%	142/125 +14,8/17,4 VK: 10%/14%	130/112 +10,1/12,6 VK: 8%/11%	120/99 +14,4/15,8 VK: 12%/16%					
nach 15' NaCl-Inf. + 45' NaCl-Inf.	107/97 +10,2/11,3 VK: 10%/12%									
nach 15' NaCl-Inf. + 45' Phenoxybenzamin- Inf.		96/83 +19,8/24 VK: 21%/29%		97/76 +14,6/14,4 VK: 15%/20%						
nach 15' NaCl-Inf. + 15' Saralasin-Inf.			130/114 +11,3/13 VK: 9%/11%		106/86 +16,3/16,7 VK: 15%/19%					
nach 15' NaCl-Inf. + 15' Saralasin-Inf. + 45' (Phenoxybenzamin u. Saralasin-Inf.)			98/83 +12,1/17,5 VK: 12%/21%		83/64 +11,6/10,8 VK: 14%/17%					

Tab. II: Gemittelte arterielle Blutdruckwerte (syst./diast.) der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30µg/ml), bzw., der mit Phenoxybenzamin und Saralasin kombiniert behandelten Gruppen

HERZFREQUENZ (min ⁻¹)	Kontrolle	Phenoxybenz.- Inf.	Phenoxybenz. + Saralasin- Inf.	Phenoxybenz.- Inf.	Phenoxybenz. + Saralasin- Inf.
	Gruppe I n=8	Gruppe II n=8	Gruppe III n=7	Gruppe IV n=10	Gruppe V n=8
nach 15' NaCl-Inf. +45' NaCl-Inf.	343 ± 51,5 VK: 15%	372 ± 65,5 VK: 18%	342 ± 49,4 VK: 14%	390 ± 32,2 VK: 8%	368 ± 16,7 VK: 5%
nach 15' NaCl-Inf. +45' Phenoxybenzamin- Inf.	353 ± 71 VK: 20%	401 ± 88,6 VK: 20%		424 ± 30,2 VK: 7%	
nach 15' NaCl-Inf. +15' Saralasin-Inf.			344 ± 24,3 VK: 7%		368 ± 18,7 VK: 5%
nach 15' NaCl-Inf. +45' (Phenoxybenzamin u. Saralasin-Inf.)			345 ± 34,2 VK: 10%		378 ± 28,9 VK: 8%

Tab. III: Gemittelte Herzfrequenzwerte (min⁻¹) der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30µg/ml), bzw. der mit Phenoxybenzamin und Saralasin kombiniert behandelten Gruppen

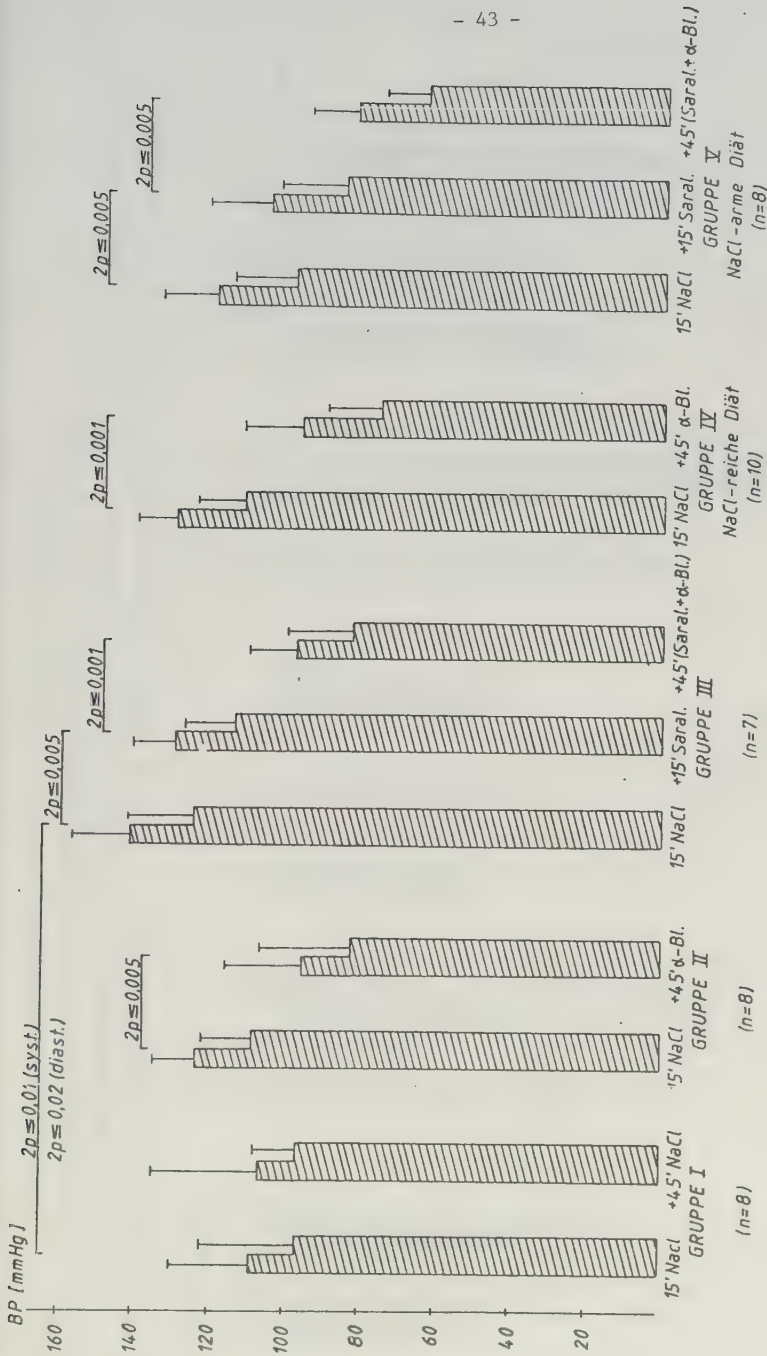


Abb. 19: Gemittelte Blutdruckwerte (syst./diast.) der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phencybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30µg/ml), bzw. der mit Phencybenzamin (1mg/ml) und Saralasin (30µg/ml) kombiniert behandelten Ratten Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: 30µl/min

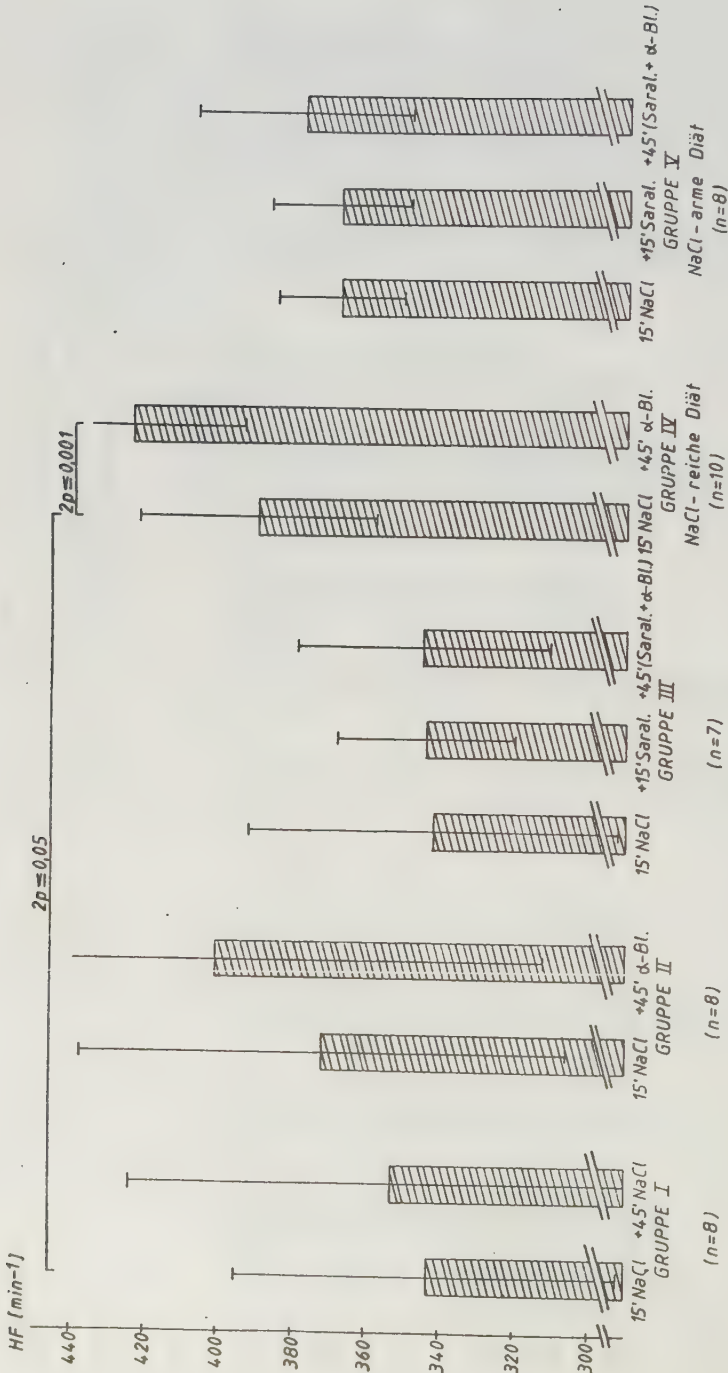


Abb. 20: Mittlere Herzfrequenzwerte (min^{-1}) der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin ($30\mu\text{g/ml}$), bzw. der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) und Saralasin ($30\mu\text{g/ml}$) kombiniert behandelten Ratten
Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: $30\mu\text{l/min}$

signifikant von der Kontrollgruppe (Gruppe I). Nur bei Gruppe III liegt der gemittelte Blutdruck nach 15 Minuten 0,9% NaCl-Infusion signifikant ($2p \leq 0,01$ syst, $2p \leq 0,02$ diast) höher. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die Eingewöhnungszeit der Ratten zwischen Lieferung aus der Tierzuchtfirma und Versuchsbeginn bei dieser Gruppe zu kurz war, so daß die Tiere der Gruppe III noch unter den Einwirkungen des Transportstresses standen.

Die gemittelten Herzfrequenzen nach 15 Minuten 0,9% NaCl-Infusion aller Versuchsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe I. Es fällt jedoch auf, daß die Herzfrequenz bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten deutlich höher ist als bei den übrigen Tieren.

Eine 45 Minuten andauernde NaCl-Infusion ruft bei der Kontrollgruppe I keine signifikante Änderung von Herzfrequenz und Blutdruck hervor.

Wie erwartet, bewirkt die Applikation des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin (1mg/ml, Infusionsgeschwindigkeit: $30 \mu\text{l}/\text{min}$) einen signifikanten Abfall des gemittelten syst. und gemittelten diast. Blutdrucks. Die Blutdruckänderung nach Alpha-Rezeptorenblockade wird nicht signifikant verändert, wenn gleichzeitig der A II-Antagonist Saralasin mitinfundiert wird. (siehe Abb. 21).

Saralasin, allein verabreicht, führt nach einem initialen, kurzfristigen Blutdruckanstieg zu einem signifikanten Abfall des arteriellen Drucks sowohl bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten (Gruppe V), als auch bei normal ernährten Ratten (Gruppe III). Die Blutdruckabfälle nach alleiniger Saralasingabe (Gruppe III und V) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Die Herzfrequenz steigt nach Alpha-Rezeptorenblockade bei den NaCl-reich ernährten Tieren (Gruppe IV) signifikant ($2p \leq 0,001$) an. Bei normal ernährten Tieren (Gruppe II) wurde ein nicht signifikanter Anstieg der Herzfrequenz

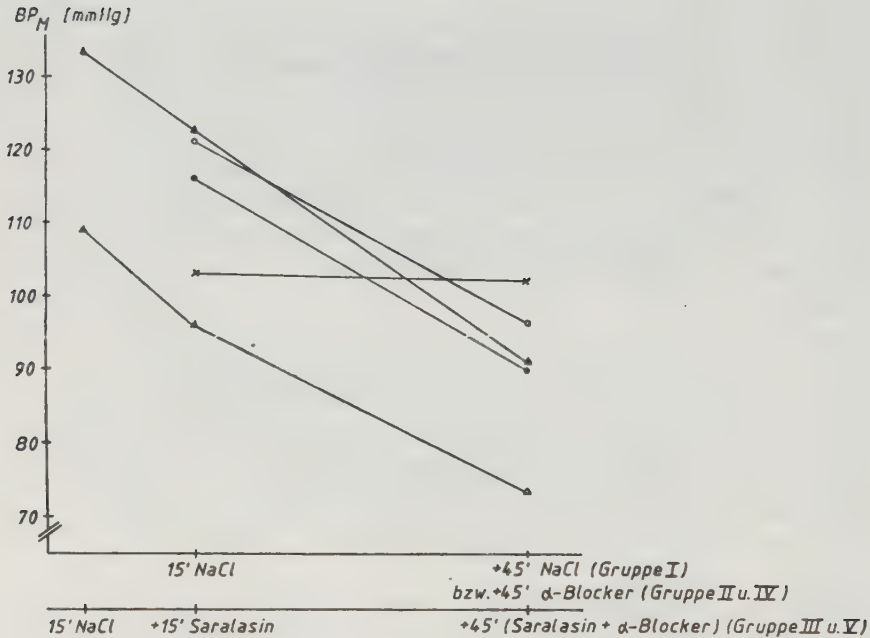


Abb. 21: Änderung des gemittelten arteriellen Mitteldrucks ($BP_M = BP_{diast} + 1/2(BP_{syst.} - BP_{diast})$) nach 0,9% NaCl-, Phenoxybenzamin-, Saralasin und kombinierter Phenoxybenzamin und Saralasin-Infusion

- ×—×=Kontrollgruppe I (0,9% NaCl-Lösung)
- =Gruppe II (Phenoxybenzamin-Inf.)
- ▲—▲=Gruppe III (Saralasin- und Phenoxybenzamin-Inf.)
- =Gruppe IV (Phenoxybenzamin-Inf., 14Tg. NaCl-reich ernährt)
- △—△=Gruppe V (Saralasin- und Phenoxybenzamin-Inf., 14Tg. NaCl-arm ernährt)

beobachtet. Betrachtet man das Verhalten der Herzfrequenz bei jedem einzelnen Versuchstier in dieser Gruppe II (siehe Abb. 22), so stieg bei 7 von 8 Infusionsversuchen die Herzfrequenz an, während sie nur in einem Experiment um $80/\text{min}^{-1}$ abfiel. Saralasin, allein infundiert, führt trotz eines

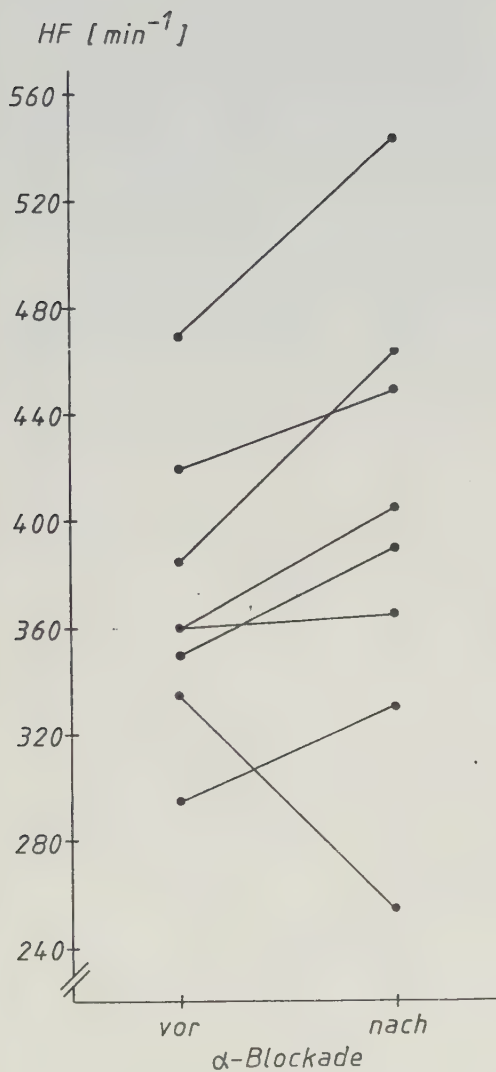


Abb. 22: Herzfrequenz vor und nach α -Rezeptorenblockade mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) bei normal ernährten Ratten

Blutdruckabfalls zu keiner Änderung der Herzfrequenz. Die kombinierte Infusion von Saralasin und Phenoxybenzamin verhindert den nach alleiniger Alpha-Rezeptorenblockade beobachteten Herzfrequenzanstieg. Dieser Unterschied der Herzfrequenzänderungen der Phenoxybenzamin behandelten Tiere einerseits und der mit Phenoxybenzamin und Saralasin behandelten Ratten andererseits ist statistisch auffällig bei den Gruppen II und III, sowie den Gruppen II und V, und wird signifikant bei den Gruppen IV und III bzw, IV und V. (Abb. 23).

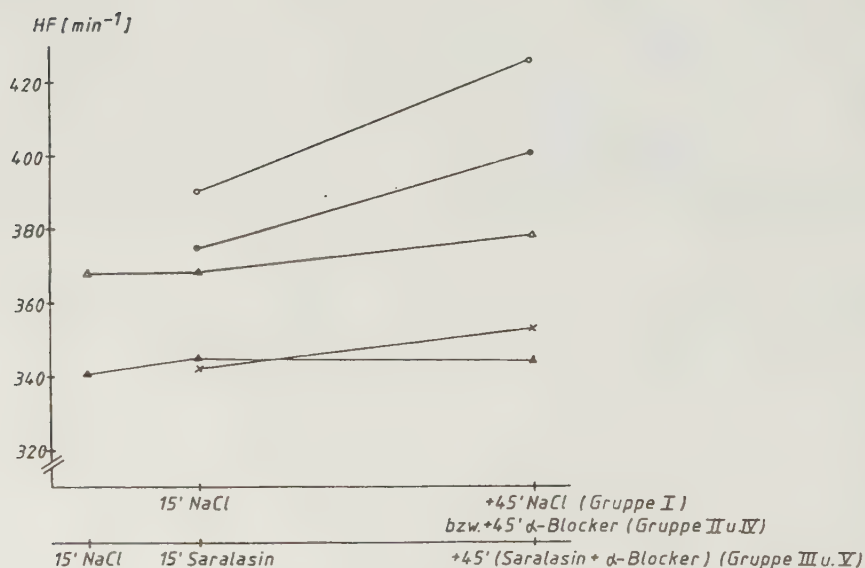


Abb. 23: Änderung der mittleren Herzfrequenz (HF) nach 0,9% NaCl-, Phenoxybenzamin-, Saralasin- und kombinierter Phenoxybenzamin und Saralasin-Infusion

- ×—× = Gruppe I (0,9% NaCl-Lösung)
- = Gruppe II (Phenoxybenzamin-Inf.)
- ▲—▲ = Gruppe III (Saralasin- und Phenoxybenzamin-Inf.)
- = Gruppe IV (Phenoxybenzamin-Inf., 14Tg. NaCl-reich ernährt)
- △—△ = Gruppe V (Saralasin- und Phenoxybenzamin-Inf., 14Tg. NaCl-arm ernährt)

II. Verhalten der Plasma-Reninaktivität (PRA)

Die PRA wurde jeweils nach Abschluß einer Infusionsperiode bestimmt, und zwar 1. nach 15 Minuten NaCl-Infusion, 2. nach 15 Minuten Saralasin-Infusion, 3. nach 45 Minuten NaCl-Infusion 4. nach 45 Minuten Phenoxybenzamin-Infusion und 5. nach 45 Minuten kombinierter Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion. In Tabelle IV sind die Mittelwerte für die PRA mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die einzelnen Versuchsgruppen zusammengestellt. Die Abb. 24 zeigt die Ergebnisse graphisch dargestellt mit den dazu eingezeichneten Standardabweichungen und Angabe der statistisch signifikanten Befunde.

Nach 14 Tagen NaCl-armer Diät (Gruppe V) liegt die PRA nach 15 Minuten NaCl-Infusion um 78% höher als die PRA bei den Kontrolltieren ($2p \leq 0,02$). Alle übrigen Plasma-Reninaktivitäten nach 15 Minuten NaCl-Infusion unterscheiden sich nicht signifikant von einander. Jedoch ist nach 14 Tagen NaCl-reicher Ernährung (Gruppe IV) die PRA mit $49\text{ng/ml}\cdot\text{h}$ deutlich niedriger als in den anderen Gruppen. Die interindividuelle Schwankungsbreite beträgt in der Gruppe IV 62% und ist damit verhältnismäßig hoch. Um sich ein genaueres Bild über diese Streuung machen zu können, ferner um die Änderung der PRA innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen als auch im Vergleich zueinander zeigen zu können, wurde die Form der Darstellung gewählt wie sie aus Abb. 25 ersichtlich ist.

Die 45-minütige Infusion von physiologischer NaCl-Lösung (Gruppe I) führt zu keiner Änderung der PRA. Die Infusion des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin (1mg/ml , $30\mu\text{l/min}$, 45 Minuten lang) bewirkt jedoch eine signifikante ($2p \leq 0,005$) Erhöhung der PRA (Gruppe II). Bei NaCl-reich ernährten Tieren (Gruppe IV) mit supprimierten RAS wird eine ähnliche Wirkung nicht beobachtet. Hier bleibt die PRA unverändert. Die alleinige Infusion des A II-Antagonisten Saralasin ($30\mu\text{g/ml}$,

<u>PRA (ng/ml.h)</u>	Kontrolle	Phenoxybenz.- Inf.	Phenoxybenz.- + Saralasin- Inf.	Phenoxybenz.- Inf.	Phenoxybenz.- + Saralasin- Inf.
nach 15' NaCl-Inf.	Gruppe I n=9 $64 \pm 23,9$ VK: 37%	Gruppe II n=8 $59 \pm 18,9$ VK: 32%	Gruppe III n=7 $65 \pm 31,5$ VK: 48%	Gruppe IV n=10 $49 \pm 30,1$ VK: 62%	Phenoxybenz.- + Saralasin- Inf. 14Tg. NaCl- reiche Diät arme Diät Gruppe V n=8 $113 \pm 35,6$ VK: 31%
nach 15' NaCl-Inf. +45' NaCl-Inf.	$59 \pm 23,3$ VK: 39%				
nach 15' NaCl-Inf. +45' Phenoxybenzamin- Inf.		128 $\pm$ 46,1 VK: 35%		72 $\pm$ 67,9 VK: 94%	
nach 15' NaCl-Inf. +15' Saralasin-Inf.			117 $\pm$ 80,3 VK: 68%		467 $\pm$ 97,8 VK: 21%
nach 15' NaCl-Inf. +15' Saralasin-Inf. +45' (Phenoxybenzamin u. Saralasin-Inf.)			236 $\pm$ 168,1 VK: 71%		413 $\pm$ 110,9 VK: 27%

Tab. IV: Mittelwerte der PRA (ng/ml.h) mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30µg/ml), bzw. der mit Phenoxybenzamin und Saralasin kombiniert behandelten Gruppen

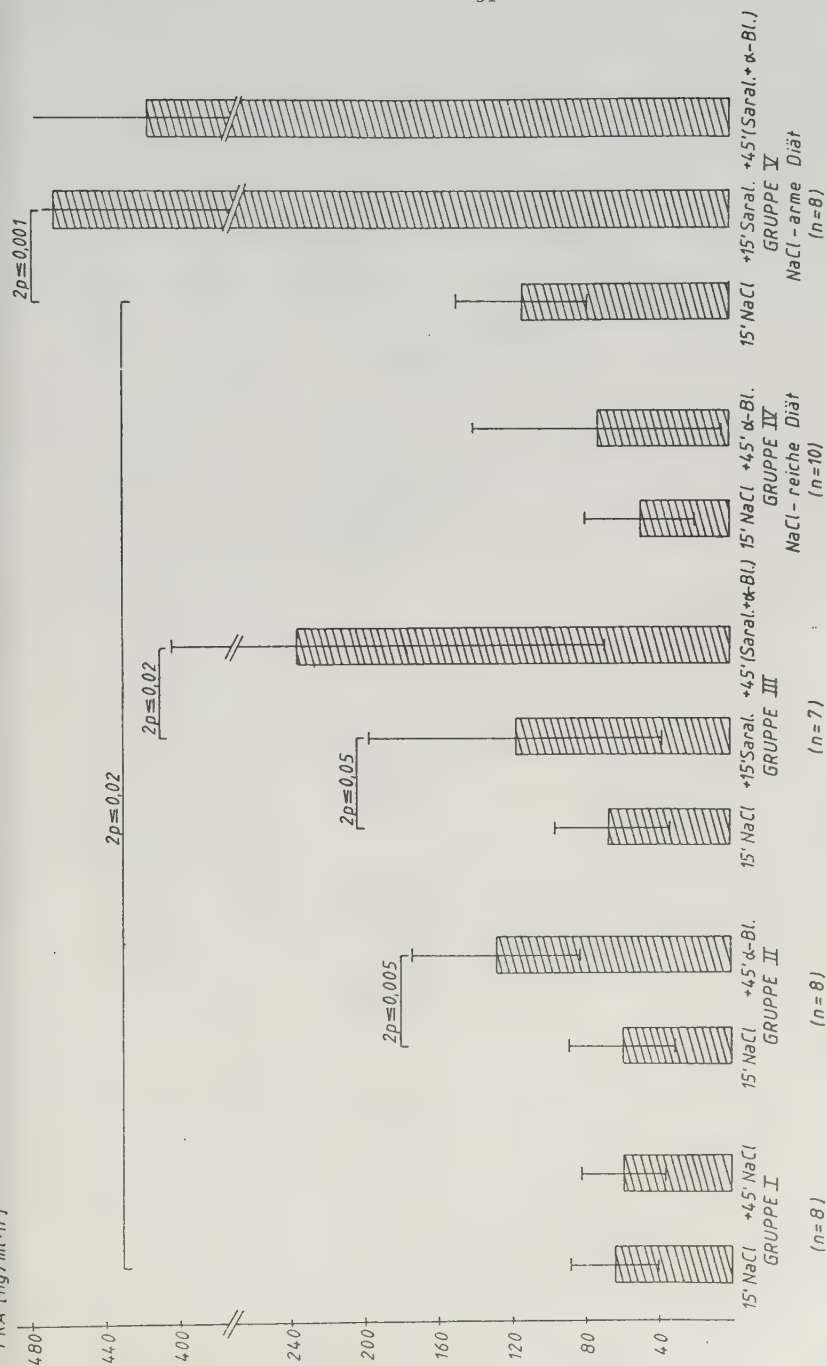


Abb. 24: Mittelwerte der PRA (ng/ml·h) der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30µg/ml), bzw. der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) und Saralasin (30µg/ml) kombiniert behandelten Gruppen Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: 30µl/min

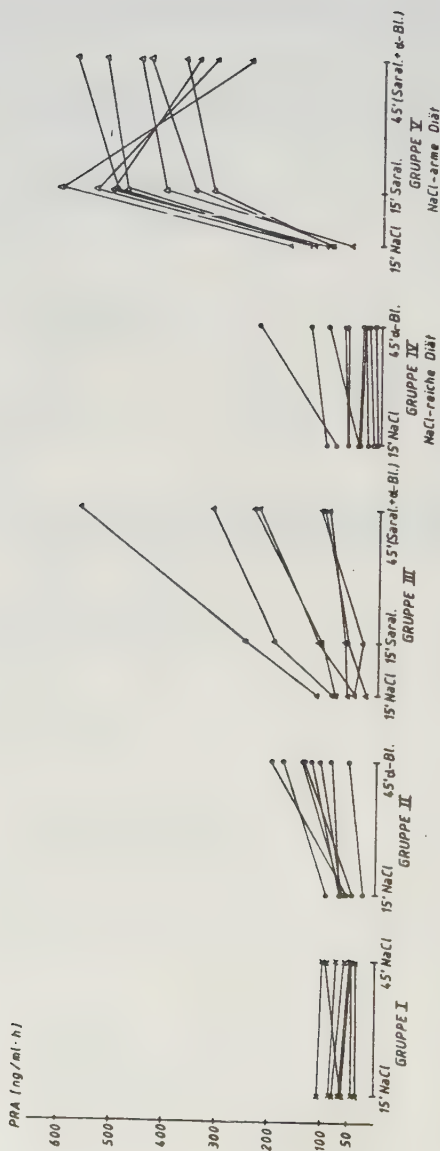


Abb. 25: Verhalten der PRA vor und nach Applikation von physiologischer NaCl-Lösung, Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin ($30\mu\text{g/ml}$), bzw. kombiniert von Phenoxybenzamin (1mg/ml) und Saralasin ($30\mu\text{g/ml}$).
 Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: $30\mu\text{l/min}$

30 μ l/min, 15 Minuten lang) führt, wie erwartet, zu einer Erhöhung der PRA, die in Gruppe III (normal ernährt) mit $2p \leq 0,05$ statistisch auffällig ist (ein Abfall der PRA ist allerdings nur bei einem Versuchstier zu beobachten, siehe Abb. 25), die aber in Gruppe V mit bereits stimulierten RAS (14 Tage NaCl-arme Diät) mit $2p \leq 0,001$ hoch signifikant ist. Außerdem ist der mittlere Anstieg der PRA auf 467 ng/ml·h in Gruppe V signifikant ($2p \leq 0,01$) höher als in Gruppe III. Die zusätzliche Applikation von Phenoxybenzamin zu Saralasin bewirkt in Gruppe III (normal ernährt) einen weiteren signifikanten ($2p \leq 0,02$) Anstieg der PRA, wohingegen in Gruppe V (NaCl-arme Diät) diese zusätzliche Infusion zu keinen weiteren Anstieg der PRA führt. In 3 von 8 Fällen kommt es sogar zu einen starken Abfall der PRA. Bei diesen 3 Tieren führte die vorherige alleinige Saralasin-Infusion zu den höchsten PRA-Anstiegen (siehe Abb. 25).

Ferner untersuchten wir, ob zwischen dem Anstieg der PRA nach Phenoxybenzamin-, Saralasin- oder kombinierter Infusion beider Pharmaka und dem vor Infusionsbeginn bestehenden PRA-Spiegel eine Korrelation besteht. Dabei zeigte sich bei normal ernährten Tieren, d.h. das RAS sollte weder im Sinne einer Supprimierung noch Stimulierung verändert sein, eine hochsignifikante ($2p \leq 0,001$) positive Korrelation zwischen diesen beiden Parametern. Je höher die PRA ist, umso stärker steigt die PRA nach Alpha-Blockade oder A II-Blockade an (Abb.26).

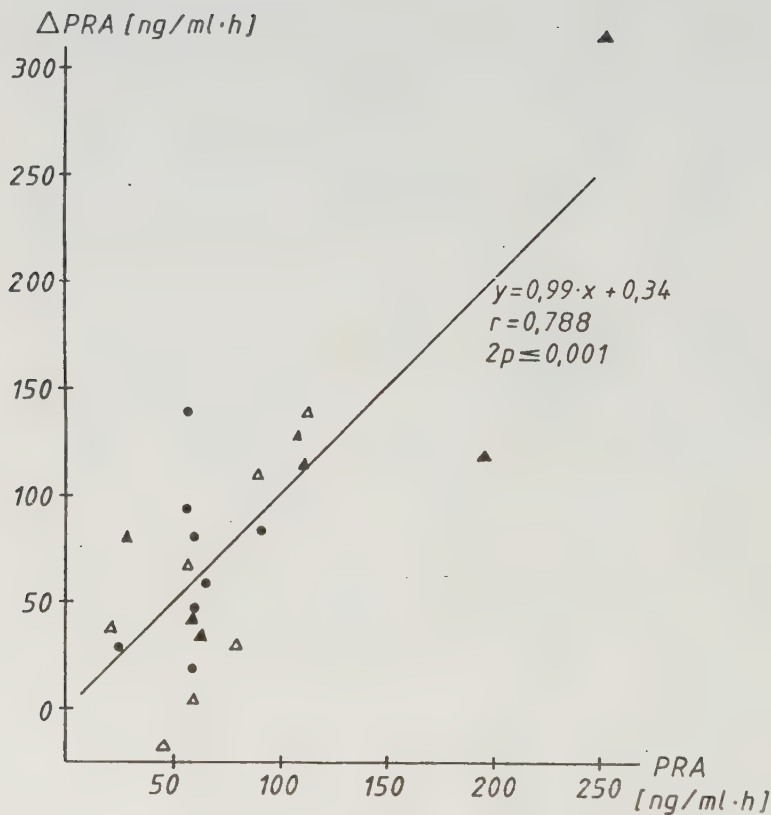


Abb. 26: Änderung der Plasma-Reninaktivität (ΔPRA) in Abhängigkeit vom Plasma-Reninaktivitätsspiegel (PRA) vor Infusionsbeginn bei normal ernährten Ratten

- $\triangle$ = nach 15' Saralasin-Infusion (Gruppe III)
- $\bullet$ = nach 45' Phenoxybenzamin-Infusion (Gruppe II)
- $\blacktriangle$ = nach 45' Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion (Gruppe III)

III. Verhalten der Plasma-Converting enzyme-Aktivität (PCEA)

Auch die PCEA wurde, wie die PRA, jeweils nach Abschluß einer Infusionsperiode bestimmt, und zwar nach 1. 15 Minuten NaCl-Infusion, 2. 15 Minuten Saralasin-Infusion 3. 45 Minuten NaCl-Infusion, 4. 45 Minuten Phenoxybenzamin-Infusion und 5. 45 Minuten kombinierter Phenoxybenzamin- und Saralasin-Infusion. In Tabelle V sind die Mittelwerte der PCEA mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der einzelnen Versuchsgruppen zusammengestellt. Die Abb. 27 zeigt diese Werte graphisch dargestellt mit eingezeichneten Standardabweichungen und Kennzeichnung der statistisch signifikanten Befunde. Da auch hier die Variabilität innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen verhältnismäßig hoch ist, ferner um das Verhalten der PCEA bei jedem einzelnen Versuchstier vor und nach den einzelnen Infusionen darstellen zu können, wurden in Abb. 28 die Ergebnisse für die einzelnen Versuchstiere graphisch dargestellt.

Die PCEA liegt bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Tieren (Gruppe IV) nach 15 Minuten NaCl-Infusion um 83% signifikant ($2p \leq 0,01$) höher als in der Kontrollgruppe I mit normaler Diät. In allen übrigen Gruppen unterscheiden sich die mittleren PCEA-Werte nach 15 Minuten NaCl-Infusion nicht signifikant voneinander, auch nicht bei Gruppe V mit NaCl-armer Diät.

Die weitere intravenöse Infusion von physiologischer NaCl-Lösung (Kontrollgruppe I) bewirkt keine Änderung der PCEA. In Gruppe II (normal ernährt) führt die alleinige Infusion von Phenoxybenzamin (1mg/ml , $30\mu\text{l/min}$) ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der PCEA, wenngleich ein kleiner Abfall ($2p \leq 0,1$) zu beobachten ist. Die PCEA reagiert aber mit einem signifikanten Abfall ($2p \leq 0,005$) in Gruppe IV (NaCl-reich ernährt) auf diese Alpha-Blockade.

Durch die alleinige Infusion von Saralasin ($30\mu\text{g/ml}$, $30\mu\text{l/min}$) kommt es weder in Gruppe III (normal ernährt) noch in Gruppe V

PCEA (μ Mol/ml.h)	Kontrolle	Phenoxybenz.- Inf.	Phenoxybenz.- + Saralasin- Inf.	Phenoxybenz.- Inf.	Phenoxybenz.- + Saralasin- Inf.
nach 15' NaCl-Inf.	Gruppe I n=9	Gruppe II n=8	Gruppe III n=7	Gruppe IV n=10	Gruppe V n=8
nach 15' NaCl-Inf. +45' NaCl-Inf.	10,3 $\pm$ 4,52 VK: 44%	9,2 $\pm$ 2,77 VK: 30%	10,1 $\pm$ 3,37 VK: 33%	18,9 $\pm$ 5,17 VK: 27%	12,1 $\pm$ 5,16 VK: 43%
nach 15' NaCl-Inf. +45' Phenoxybenzamin Inf.	9,6 $\pm$ 4,30 VK: 45%	8,4 $\pm$ 2,79 VK: 33%		13,4 $\pm$ 4,46 VK: 33%	
nach 15' NaCl-Inf. +15' Saralasin-Inf.			10,0 $\pm$ 4,38 VK: 44%		12,2 $\pm$ 5,37 VK: 44%
nach 15' NaCl-Inf. +15' Saralasin-Inf. +45' (Phenoxybenz. u. Saralasin-I.)			7,3 $\pm$ 2,83 VK: 39%		8,9 $\pm$ 3,50 VK: 40%

Tab. V: Mittelwerte der PCEA (μ Mol/ml.h) mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30 μ g/ml), bzw. der mit Phenoxybenzamin und Saralasin kombiniert behandelten Gruppen

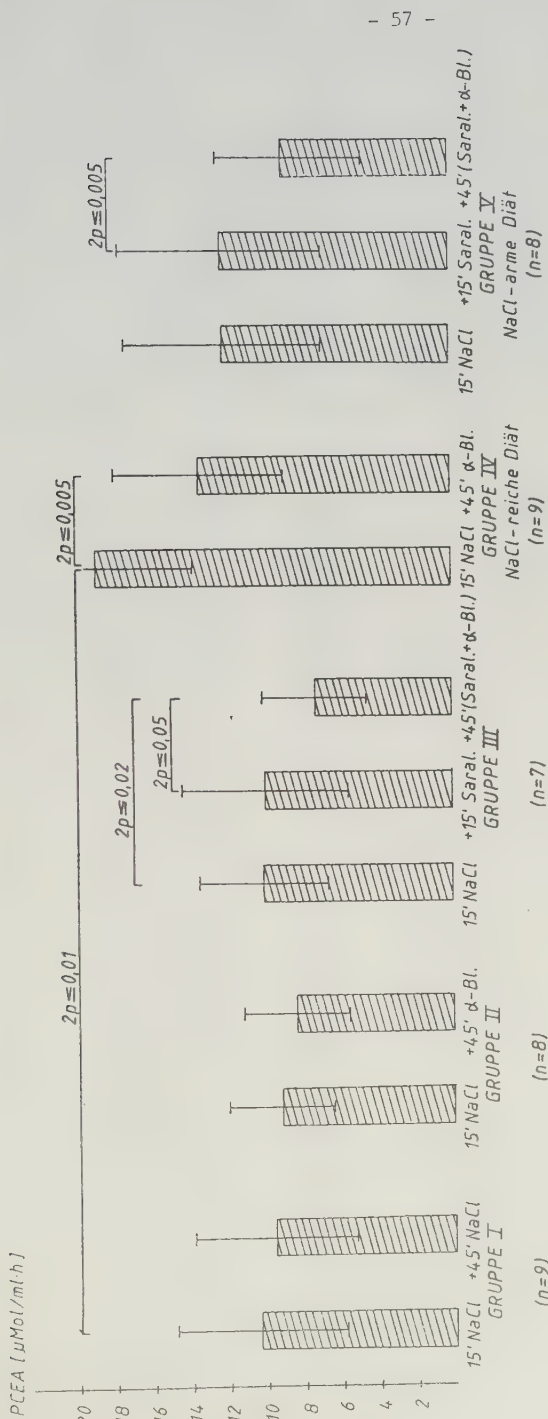


Abb. 27: Mittelwerte der PGEA ($\mu\text{Mol/ml}\cdot\text{h}$) der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin ($30\mu\text{g/ml}$), bzw. der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) und Saralasin ($30\mu\text{g/ml}$) kombiniert behandelten Gruppen Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: $30\mu\text{l/min}$

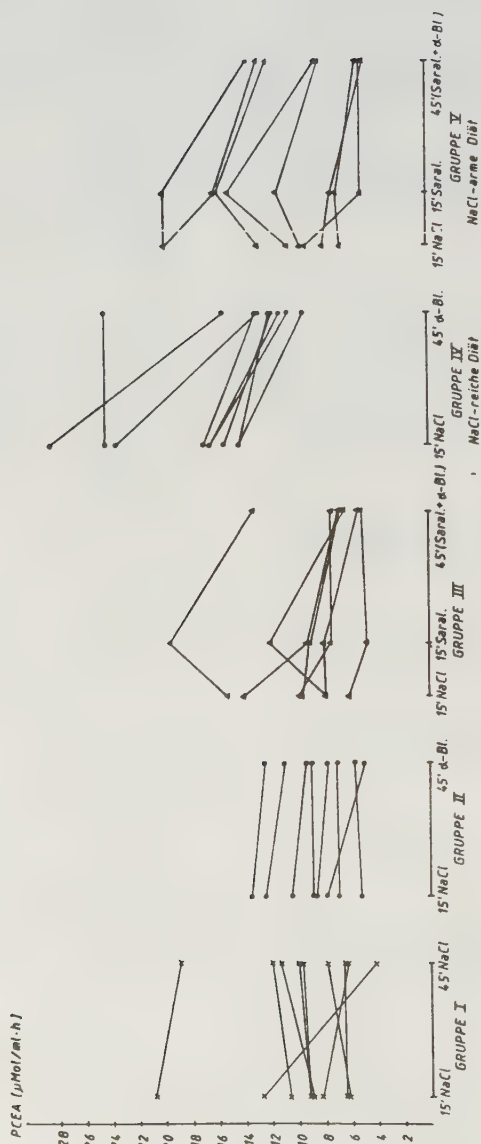


Abb. 28: Verhalten der PCEA vor und nach Applikation von physiologischer NaCl-Lösung, Phenoxylbenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30μg/ml), bzw. kombiniert von Phenoxylbenzamin (1mg/ml) und Saralasin (30μg/ml).
Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: 30μl/min

(NaCl-arm ernährt) zu einer Änderung der mittleren PCEA. Wie aus Abb. 28 aber deutlich wird, führt diese Infusion mit Saralasin bei den einzelnen Versuchstieren doch zum Teil zu erheblichen Änderungen der PCEA, und zwar sowohl im Sinne eines Anstieges als auch Abfalles. Die zusätzliche Infusion von Phenoxybenzamin zu Saralasin bewirkt in Gruppe III mit normaler Diät einen statistisch auffälligen ($2p \leq 0,05$), in Gruppe V mit NaCl-armer Diät einen signifikanten ($2p \leq 0,005$) Abfall der PCEA.

Da offensichtlich die Änderung der PCEA während der Phenoxybenzamin-Infusion von der Höhe der PCEA vor Infusionsbeginn abzuhängen schien, wurde dieser Zusammenhang näher untersucht. Dabei ergab sich eine hochsignifikante ($2p \leq 0,001$) Korrelation zwischen der Änderung der PCEA nach Alpha-Blokade und der PCEA vor Infusionsbeginn (Abb. 29). Die PCEA sank umso stärker ab, je höher die Ausgangs-PCEA war.

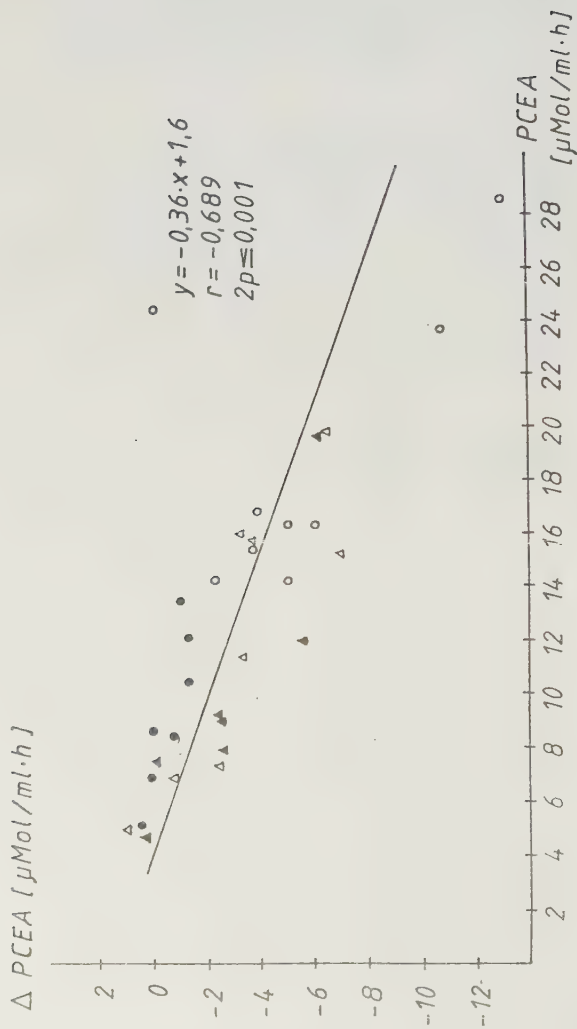


Abb. 29: Änderung der Plasma-Converting enzyme-Aktivität (ΔPCEA) nach α -Blockade mit Phenoxybenzamin (1mg/ml, 30 μ l/min) in Abhängigkeit von der PCEA vor Applikation

des Blockers

- =nach 45' Phenoxybenzamin-Infusion (Gruppe II, normal ernährt)
- =nach 45' Phenoxybenzamin-Infusion (Gruppe IV, NaCl-reich ernährt)
- ▲ =nach 45' Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion (Gruppe III, normal ernährt)
- △ =nach 45' Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion (Gruppe V, NaCl-arm ernährt)

IV. Verhalten der Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin

Zusätzlich bei NaCl-reich (Gruppe IV) und NaCl-arm (Gruppe V) ernährten Tieren wurden die Konzentrationen der beiden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Plasma mitbestimmt. Die beiden Parameter wurden deswegen nur bei Gruppe IV und V gemessen, da die Methodik erst während des Versuchslaufes zur Verfügung stand, aus den früheren Versuchen (Gruppe I, II und III) aber kein Plasma mehr vorhanden war.

In Tabelle VI sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten zusammengestellt. Die unterschiedliche Fallzahl kommt dadurch zustande, daß in einigen Fällen das Plasma zur Bestimmung nicht mehr ausreichte.

Plasma-Katecholamine (pg/ml)	Phenoxybenzamin- Inf. 14 Tage NaCl-reiche Diät		Phenoxybenzamin u. Saralasin-Inf. 14 Tage NaCl-arme Diät	
	Gruppe IV Noradrenalin	Adrenalin	Gruppe V Noradrenalin	Adrenalin
nach 15 NaCl-Inf.	2225 ± 924 VK: 42% n=8	1356 ± 1428 VK: 109% n=9	2013 ± 1619 VK: 80% n=8	688 ± 1355 VK: 196% n=8
nach 15 NaCl-Inf. +15 Saralasin- Inf.			2257 ± 1149 VK: 51% n=7	329 ± 345 VK: 104% n=7
nach 15 NaCl-Inf. +45 Phenoxybenz. Inf.	3378 ± 2092 VK: 62% n=9	1333 ± 1166 VK: 87% n=9		
nach 15 NaCl-Inf. +15 Saral.-Inf. +45 (Phenoxybenz. + Saral.-Inf.)			4883 ± 3350 VK: 69% n=6	983 ± 462 VK: 47% n=6

Tab. VI: Mittelwerte der Plasma-Konzentrationen von Adrenalin bzw. Noradrenalin (pg/ml) mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten bei 14 Tage NaCl-reich (Gruppe IV) und 14 Tage NaCl-arm (Gruppe V) ernährten Ratten

In Abb. 30 sind die Mittelwerte für die Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentrationen mit Standardabweichungen und Angabe der statistisch signifikanten Befunde graphisch dargestellt und aus Abb. 31 geht das Verhalten der beiden Katecholamine bei den einzelnen Infusionsversuchen hervor.

Die Mittelwerte der Plasma-Noradrenalin-, bzw. Adrenalin-Konzentration der Gruppe IV mit NaCl-reicher Diät unterscheiden sich nach 15 Minuten NaCl-Infusion nicht signifikant von denen der Gruppe V mit NaCl-armer Diät.

Die alleinige Phenoxybenzamin-Infusion führt zu keiner signifikanten Änderung der Noradrenalin-, bzw. der Adrenalin-Konzentration bei Gruppe IV mit NaCl-reicher Diät, wenngleich bei der Plasma-Noradrenalin-Konzentration ein Anstieg zu erkennen ist. Ein Blick auf Abb. 31 zeigt, daß die Plasma-Noradrenalin-Spiegel in 3 von 7 Fällen abfielen, und in den übrigen 4 anstiegen.

Die Infusion von Saralasin über eine Zeitdauer von 15 Minuten (Gruppe V) bewirkt keine statistisch signifikante Änderung der Mittelwerte der beiden Plasma-Katecholamine. Die Noradrenalin-Konzentration steigt unter Saralasin-Infusion allerdings in 6 Fällen an und nur einmal kommt es zu einem Abfall (siehe Abb. 31). Würde man diesen Abfall nicht berücksichtigen, so wäre der beobachtete Noradrenalinanstieg statistisch auffällig ($2p \leq 0,05$). Im übrigen stammt das Plasma, in dem der eben beschriebene Abfall der Noradrenalin-Konzentration festgestellt wurde, vom gleichen Versuchstier, bei dem auch ein starkes Absinken der Adrenalin-Konzentration beobachtet wurde. Unter kombinierter Phenoxybenzamin- und Saralasin-Infusion steigen die beiden Plasma-Katecholamine weiter an, wobei für die mittlere Plasma-Adrenalin-Konzentration eine statistisch auffällige ($2p \leq 0,02$) Erhöhung ermittelt werden kann.

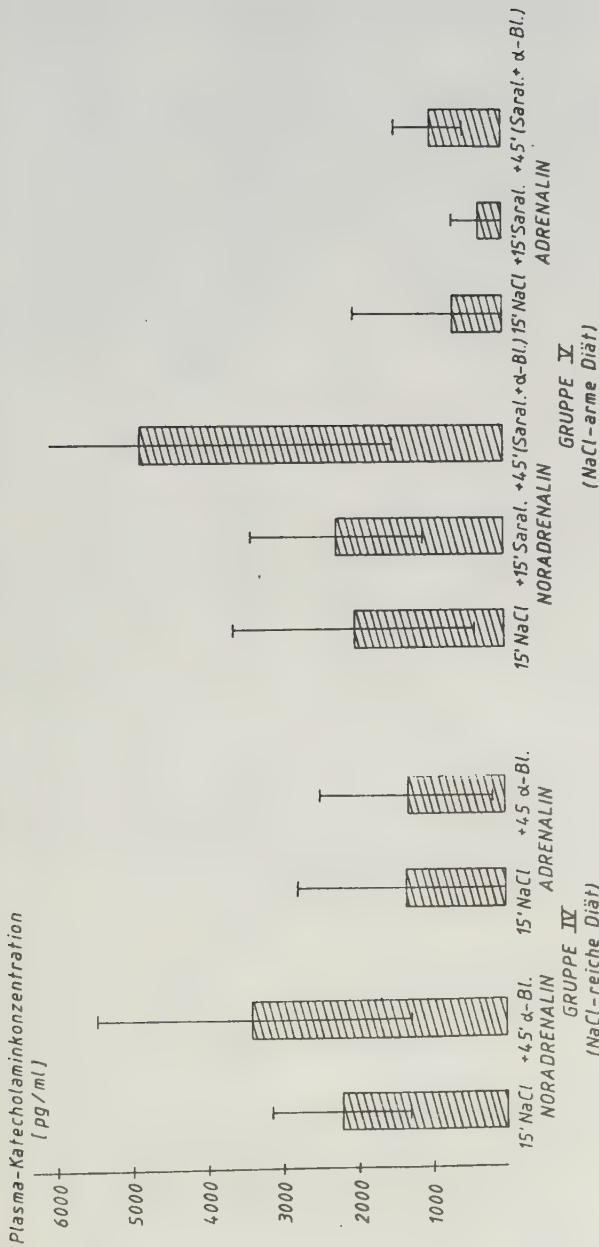


Abb. 30: Mittlere Plasma-Katecholaminkonzentrationen (pg/ml) von Adrenalin und Noradrenalin bei den mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) behandelten, 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten und bei den mit Saralasin (30µg/ml) und Phenoxybenzamin (1mg/ml) behandelten 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten
 Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: 30µl/min

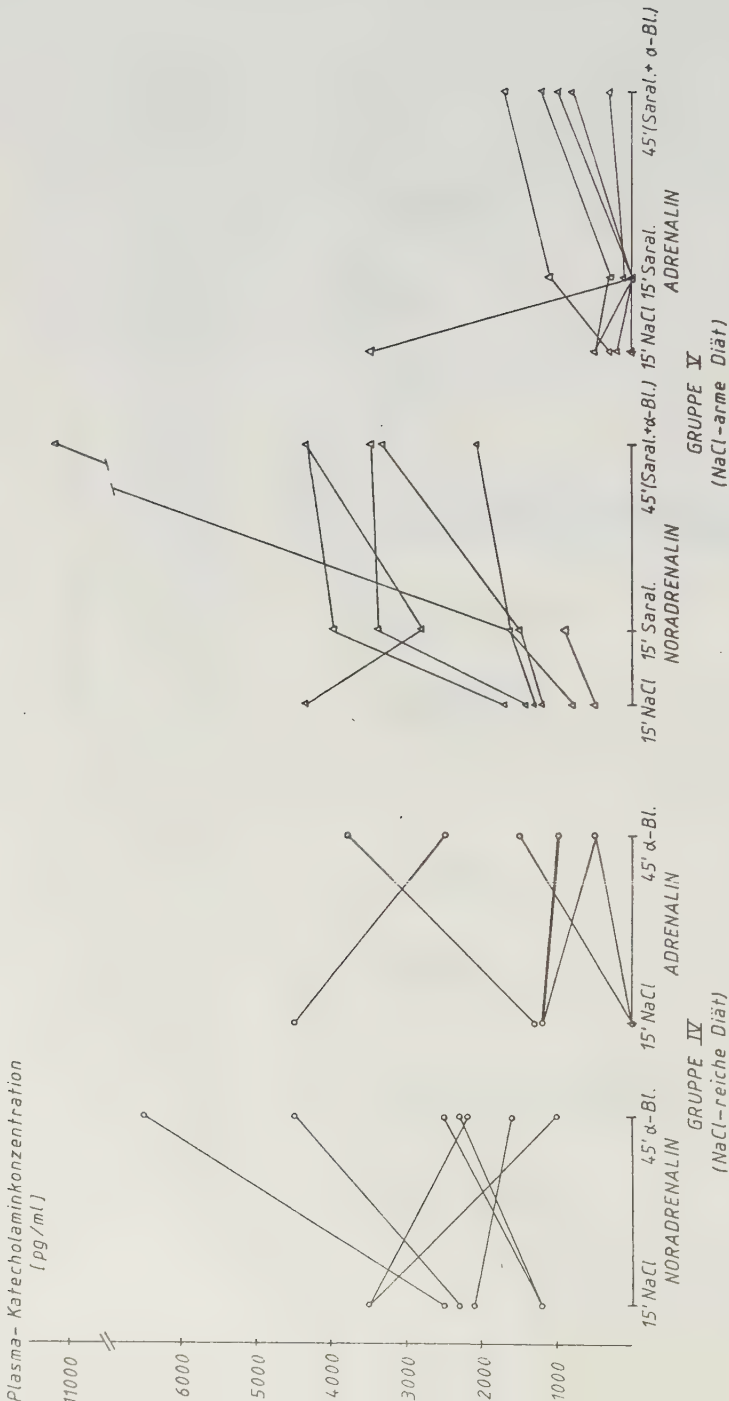


Abb. 31: Verhalten der Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin vor und nach Applikation von Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30µg/ml), bzw. kombiniert von Phenoxybenzamin (1mg/ml) und Saralasin (30µg/ml)
Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: 30µl/min

V. Verhalten von Renin und Converting enzyme in der Nierenrinde

Nach Beendigung der jeweiligen Infusionsversuche wurden den Ratten die Nieren blutfrei gespült, anschließend entnommen und die Nierenrinden homogenisiert wie unter B I.3. beschrieben. In der Nierenrinde wurden die Reninkonzentration und Converting enzyme-Aktivität bestimmt.

Die Mittelwerte mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die einzelnen Versuchsgruppen sind in Tabelle VII zusammengestellt.

	Kontrolle Gruppe I	Phenoxyb.- Inf. Gruppe II	Phenoxyb.- +Saral.-Inf. Gruppe III	Phenoxyb.- Inf. 14Tg. NaCl- reiche Diät Gruppe IV	Phenoxyb.- +Saral.-I 14Tg. NaC arme Diät Gruppe V
Reninkonz. (ng/g·h)	296 ± 68,9 VK: 23% n=6	271 ± 119 VK: 44% n=4	286 ± 98,7 VK: 34% n=4	113 ± 42,1 VK: 37% n=10	313 ± 109 VK: 35% n=8
INCEA (μMol/g·h) (Inkubat.- pH: 6,0)	16,7±8,3 VK: 50% n=7	16,3±10,2 VK: 62% n=7	22,7±6,6 VK: 29% n=5	14,4±5,4 VK: 37% n=10	14,8±2,9 VK: 20% n=8

Tab. VII: Mittelwerte der Reninkonzentration (ng/g·h) und der iso-Converting enzyme-Aktivität (μMol/g·h) im Nierenrindenhomogenat mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten

In Abb. 32 und Abb. 33 sind diese Mittelwerte graphisch dargestellt mit Standardabweichungen und Kennzeichnung der statistisch signifikanten Veränderungen.

Die Infusion von Phenoxybenzamin bei normal ernährten Ratten (Gruppe II) führt zu keiner Änderung weder der NRC noch der INCEA im Vergleich zur Kontrollgruppe I. Auch die kombinierte Applikation von Phenoxybenzamin und Saralasin bewirkt keine

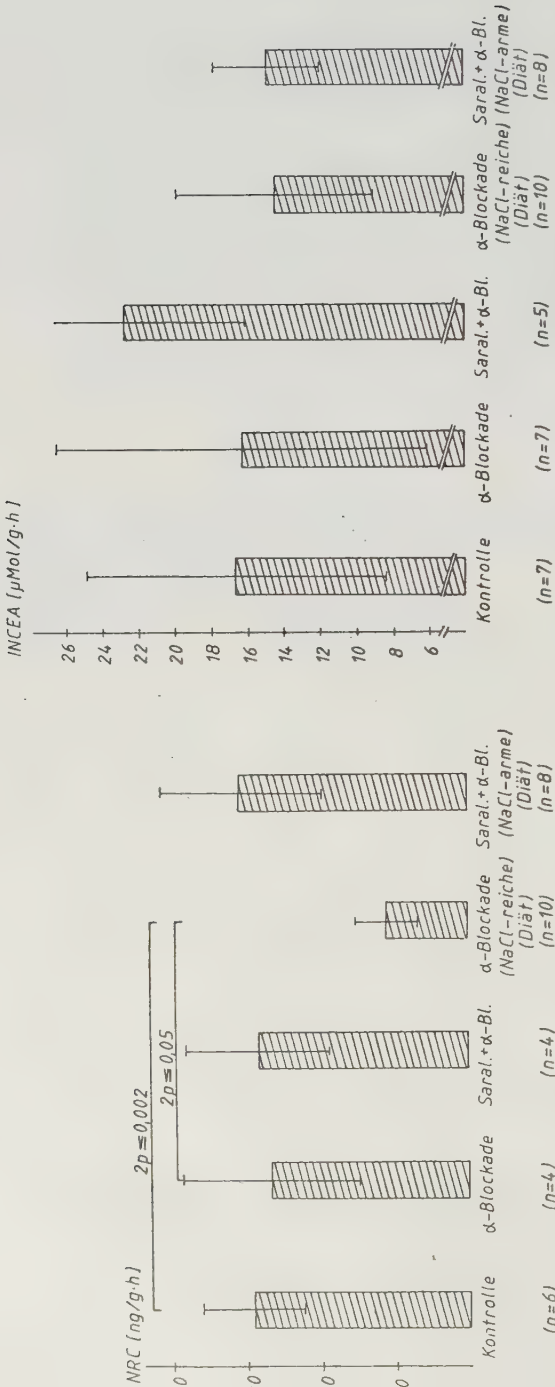


Abb. 32: Mittlere Nierenrinden-Reninkonzentration (NRC) der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30μg/ml), bzw. der mit Phenoxybenzamin und Saralasin kombiniert behandelten Gruppen

Abb. 33: Mittlere Nierenrinden-iso-Converting-enzyme Aktivität (INCEA) der Kontrollgruppe (0,9% NaCl-Lösung) und der mit Phenoxybenzamin (1mg/ml) oder Saralasin (30μg/ml), bzw. der mit Phenoxybenzamin und Saralasin kombiniert behandelten Gruppen

Infusionsgeschwindigkeit bei allen Versuchen: 50μl/min

Änderung des Reningehaltes der Nierenrinde, wohingegen für die INCEA ein Anstieg zu beobachten ist (Gruppe III), der allerdings weder im Vergleich zur Kontrollgruppe I noch zur Phenoxybenzamin-behandelten Gruppe II signifikant ist.

Bei Gruppe IV (NaCl-reich ernährt) ist die Reninkonzentration nach Phenoxybenzamin-Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe I (normal ernährt) signifikant ($2p \leq 0,002$) niedriger. Im Vergleich zur Gruppe II (normal ernährt, Phenoxybenzamin-Infusion) findet sich bei Gruppe IV eine statistisch auffällige Erniedrigung des Reningehalts ($2p \leq 0,05$). Nach kombinierter Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion liegt die NRC bei NaCl-arm ernährten Ratten etwas höher, jedoch nicht signifikant, als bei normal ernährten Ratten mit demselben Infusionsschema (Gruppe III).

Die INCEA von Gruppe II (normal ernährt) und Gruppe IV (NaCl-reich ernährt) mit alleiniger Phenoxybenzamin-Infusion unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Ferner ist die INCEA der NaCl-reich ernährten Ratten nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe I (normal ernährt). Nach kombinierter Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion liegt die INCEA bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten (Gruppe V) statistisch auffällig ($2p \leq 0,05$) niedriger als bei normal ernährten Ratten mit demselben Infusionsschema (Gruppe III). Die INCEA von Gruppe V unterscheidet sich ansonsten aber nicht von den übrigen Gruppen.

VI. Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern

Es wurde hier insbesondere darauf geachtet, ob Korrelationen bestehen zwischen Parametern des RAS (PRA, PCEA, NRC, INCEA) und denen des sympathico-adrenergen Systems (Herzfrequenz, Blutdruck, Plasma-Katecholamine). Ferner wurde untersucht, ob zwischen den gemessenen Werten des RAS gegenseitige Wechselwirkungen festzustellen sind. Das Augenmerk galt hier vor allen Dingen den beiden im Nierenrindenhomogenat bestimmten Enzymen Renin und iso-Converting enzyme in Korrelation zum Plasma-Renin und Plasma-Converting enzyme.

Da das RAS mit Angiotensin II über ein Hormon verfügt, das einen starken Einfluß auf den peripheren Widerstand ausübt, wurde untersucht, ob eine Beziehung herzustellen ist zwischen der PRA, bzw. der PCEA und dem diastolischen Blutdruck, der als ein Indikator für den peripheren Widerstand betrachtet werden kann. Während sich bei normal ernährten Tieren keine signifikante Beziehung zeigte zwischen der PRA bzw. der PCEA und dem diastolischen Blutdruck, besteht eine signifikante Korrelation ($2p \leq 0,01$) zwischen der PRA und dem diastolischen Blutdruck bei NaCl-arm ernährten Tieren (Gruppe V) in dem Sinne, daß ein hoher diastolischer Blutdruck mit niedriger PRA einhergeht und umgekehrt (siehe Abb. 34). Diese signifikante Beziehung besteht auch zwischen der PRA und dem mittleren Blutdruck bei NaCl-arm ernährten Ratten nach 15 Minuten NaCl-Infusion (siehe Abb. 35). Für die PCEA kann ein ähnliches Verhalten nicht beobachtet werden (siehe Abb. 36).

Der Abfall des diastolischen Blutdrucks nach Alpha-Blockade mit Phenoxybenzamin bei NaCl-reich ernährten Tieren (Gruppe IV) ist signifikant ($2p \leq 0,01$) korreliert mit der Änderung der PRA. Wie Abb. 37 zeigt, steigt die PRA umso stärker an, je weiter der diastolische Blutdruck abfällt.

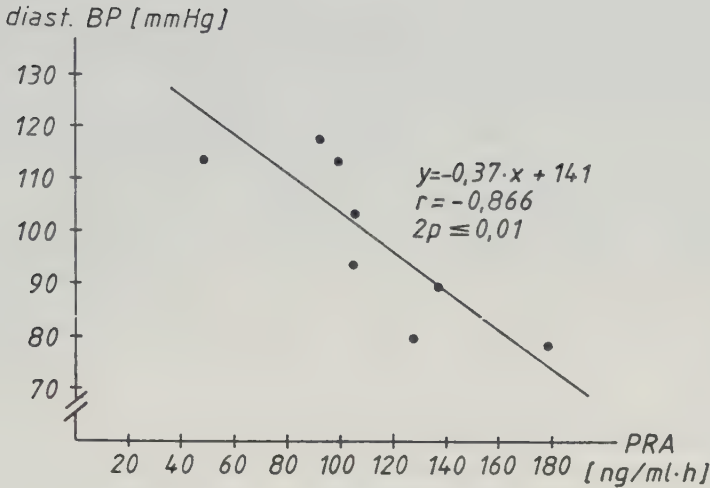


Abb. 34: Beziehung zwischen dem diastolischen Blutdruck (diast. BP) und der Plasma-Reninaktivität (PRA) nach 15 Minuten 0,9% NaCl-Infusion bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten (Gruppe V)

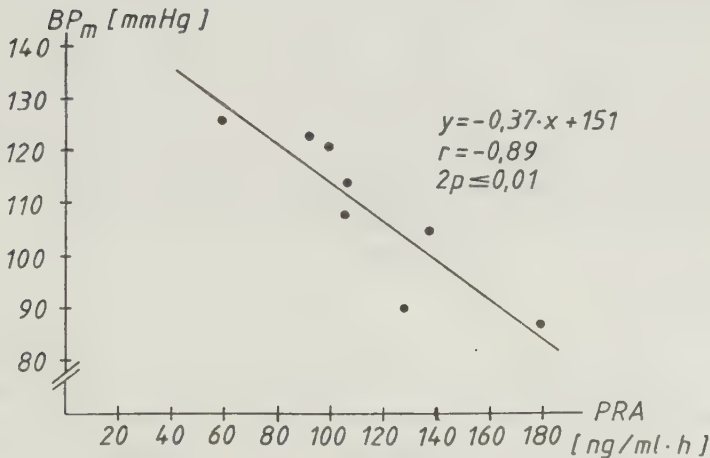


Abb. 35: Beziehung zwischen mittleren Blutdruck (BP_m $BP_m = BP_{diast.} + 1/2(BP_{syst.} - BP_{diast.})$) und Plasma-Reninaktivität (PRA) nach 15 Minuten 0,9% NaCl-Infusion bei NaCl-arm ernährten Ratten (Gruppe V)

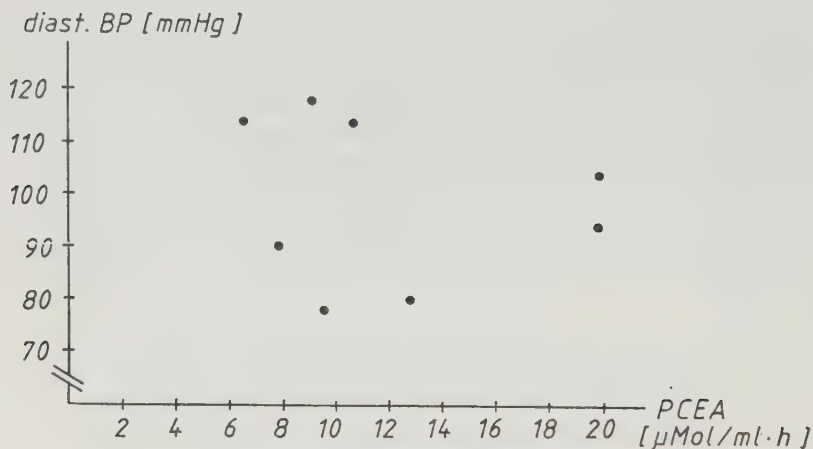


Abb. 36: Beziehung zwischen dem diastolischen Blutdruck (diast. BP) und der Plasma-Converting enzyme-Aktivität (PCEA) nach 15 Minuten NaCl-Infusion bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten (Gruppe V)

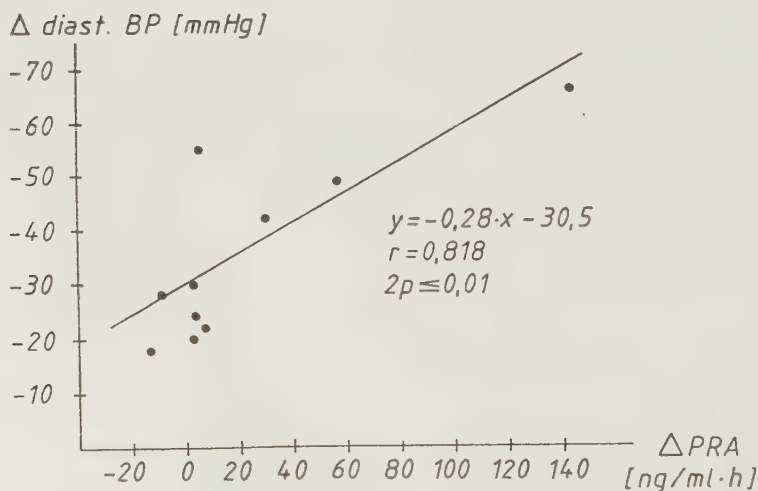


Abb. 37: Beziehung zwischen der Änderung des diastolischen Blutdrucks (Δ diast. BP) und der Änderung der Plasma-Reninaktivität (Δ PRA) nach 45 Minuten Phenoxybenzamin-Infusion bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten (Gruppe IV)

Ferner fand sich eine signifikante ($2p \leq 0,01$) Korrelation zwischen der Änderung des diastolischen Blutdrucks und der Änderung der PCEA nach kombinierter Infusion von Phenoxybenzamin und Saralasin bei NaCl-arm ernährten Tieren (Gruppe V). Der diastolische Blutdruck sinkt umso mehr ab, je geringer die PCEA abfällt (Abb. 38). Für alle übrigen Gruppen konnten keine statistisch signifikanten Beziehungen festgestellt werden.

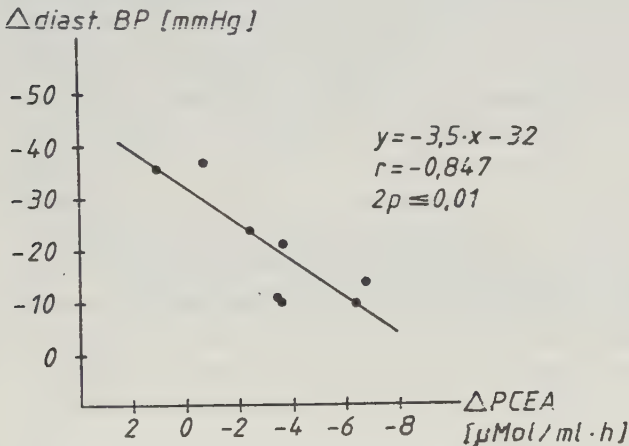


Abb. 38: Beziehung zwischen der Änderung des diastolischen Blutdrucks ($\Delta \text{diast. BP}$) und der Änderung der Plasma-Converting enzyme-Aktivität (ΔPCEA) nach 45 Minuten kombinierter Phenoxybenzamin- und Saralasin-Infusion bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten (Gruppe V)

In der Herzfrequenz ist ein Parameter zu sehen, der eine Aussage über den Aktivitätsgrad des SAS erlaubt. Es wurde daher untersucht, ob zwischen der Herzfrequenz und der PRA bzw. PCEA eine Beziehung besteht. Wie aus Abb. 39 deutlich wird, zeigt sich hier eine signifikante ($2p \leq 0,01$) Beziehung zwischen der PRA und der Herzfrequenz nach 15 Minuten NaCl-

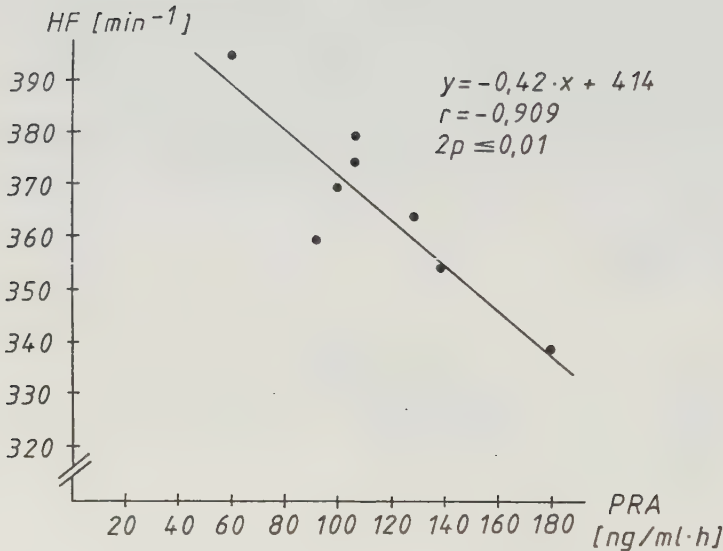


Abb. 39: Beziehung zwischen der Herzfrequenz (HF) und der Plasma-Reninaktivität (PRA) nach 15 Minuten 0,9% NaCl-Infusion bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten (Gruppe V)

Infusion bei NaCl-arm ernährten Tieren (Gruppe V). Für alle übrigen Gruppen läßt sich keine Abhängigkeit erkennen. Für die PCEA konnte bei keiner Versuchsgruppe eine Beziehung zur Herzfrequenz hergestellt werden.

Da der Anstieg der Herzfrequenz nach Alpha-Blockade reflektorisch bedingt ist durch die in der Peripherie wirksam werdende Vasodilatation mit konsekutiven Blutdruckabfall, sollte man an der Reaktion der Herzfrequenz einen Hinweis auf die sympathiko-adrenerge Stimulierung des jeweiligen Versuchstieres sehen können. Untersucht man daher, ob eine Beziehung zwischen der Herzfrequenzänderung und der PRA, bzw. der PCEA, bzw. deren Änderungen besteht, so erhält man

indirekt auch einen Hinweis auf die Einflußnahme des Vegetativums auf das RAS. Wie aus Abb. 40 oben ersichtlich wird, scheint bei normal ernährten Tieren ein Ansteigen der Herzfrequenz nach Alpha-Blockade auch mit einem Anstieg der PRA verknüpft zu sein, während sich dies für Tiere mit NaCl-reicher Diät (Gruppe IV) nicht nachvollziehen läßt. Für die PCEA ist keine derartige Beziehung zu beobachten. (siehe Abb. 40 unten). Ferner fand sich weder für die Herzfrequenz noch deren Änderung eine Korrelation zur NRC oder INCEA in sämtlichen Versuchsgruppen.

Da bei den Versuchsgruppen IV (NaCl-reich ernährt, Phenoxybenzamin-Infusion) und V (NaCl-arm ernährt, Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion) auch die beiden Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin mitbestimmt wurden, war es vor allem hier von Interesse zu kontrollieren, ob sich Beziehungen zwischen den Katecholaminen und Parametern aus dem RAS finden ließen. Da die Streuung der gemessenen Katecholaminkonzentrationen allerdings verhältnismäßig hoch war, durfte man von vorneherein nur eventuelle Trends erwarten.

Zunächst wurden die gemessenen Katecholaminwerte in Bezug gesetzt zu weiteren Parametern aus dem SAS, nämlich Herzfrequenz und Blutdruck. Während nach 15 Minuten NaCl-Infusion in beiden Gruppen keine Korrelationen bestehen zwischen den Plasma-Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin einerseits und der Höhe der Herzfrequenz und des Blutdrucks andererseits, ist die Änderung der Katecholaminkonzentration nach Alpha-Blockade in Gruppe IV (NaCl-reich ernährt) statistisch auffällig ($2p \leq 0,05$) korreliert zur Höhe des beobachteten Blutdruckabfalls unter dieser Phenoxybenzamin-Infusion (siehe Abb. 41). Eine ähnliche Beziehung war in Gruppe V (NaCl-arm ernährt, Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion) nicht nachweisbar, weder unter alleiniger Saralasin-Infusion noch unter kombinierter Saralasin- und Phenoxybenzamin-Applikation.

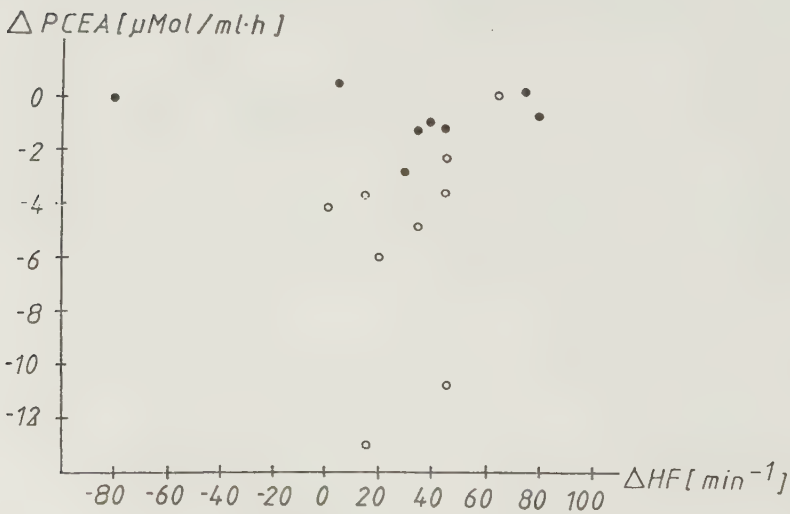
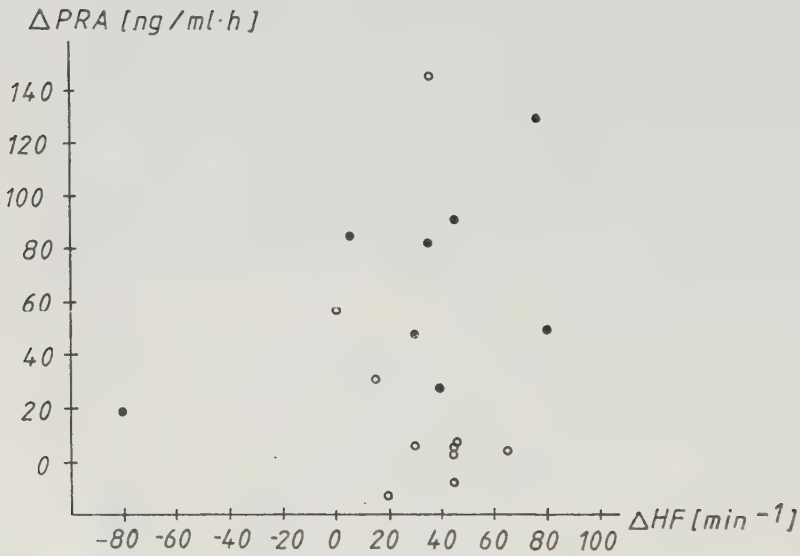


Abb. 40: Beziehung zwischen der Änderung der Herzfrequenz (ΔHF) und der Änderung der Plasma-Reninaktivität (ΔPRA) oben und der Plasma-Converting enzyme-Aktivität ($\Delta PCEA$) unten nach 45 Minuten Phenoxymethylamin-Infusion bei normal (•) und NaCl-reich (○) ernährten Ratten

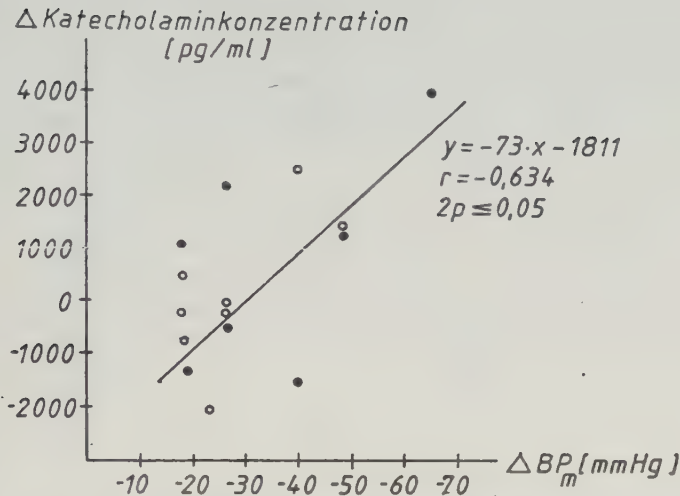


Abb. 41: Änderung der Plasma-Noradrenalin- (•), bzw. der Plasma-Adrenalin-Konzentration (◦) in Abhängigkeit von der Änderung des mittleren Blutdrucks (PB_m) nach 45 Minuten Phenoxybenzamin-Infusion bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten (Gruppe IV)

Es wurde dann weiter geprüft, ob eine Beziehung besteht zwischen der PRA, bzw. der PCEA und den Katecholaminen nach 15 Minuten NaCl-Infusion. Dabei scheint sich bei NaCl-reich ernährten Tieren (Gruppe IV) ein Trend dahingehend zu zeigen, daß mit ansteigendem Noradrenalingehalt des Plasmas auch die PRA, bzw. die PCEA zunimmt. (siehe Abb. 42). Bei NaCl-arm ernährten Tieren konnte keine derartige Beziehung gefunden werden.

Bei dem Anstieg der PRA nach Alpha-Blockade wurde bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten (Gruppe IV) eine statistisch auffällige ($2p \leq 0,05$) Beziehung zur Änderung der Katecholamine ermittelt. Je stärker die Katecholamine ansteigen, umso höher ist auch die Änderung der PRA (Abb. 43). Diese

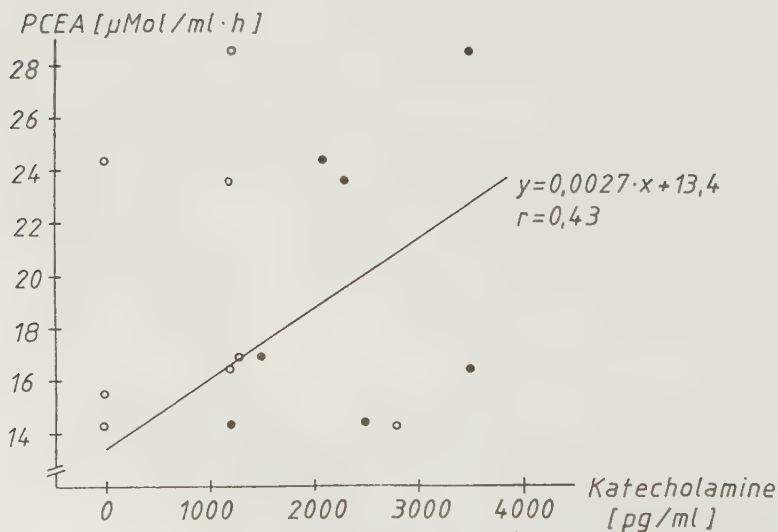
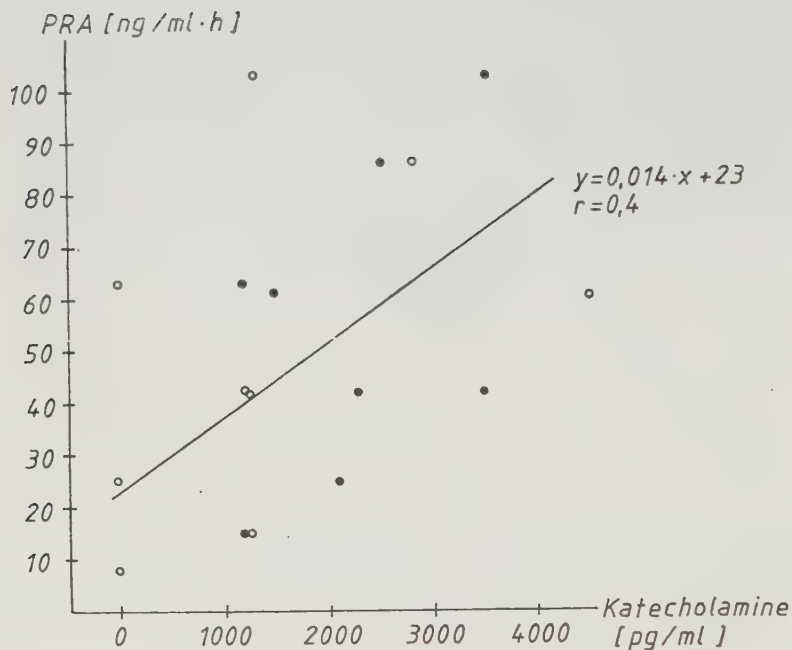


Abb. 42: Beziehung zwischen der Plasma-Katecholaminkonzentration (●=Noradrenalin, ○=Adrenalin) und der PRA oben, bzw. der PCEA unten nach 15 Minuten 0,9% NaCl-Infusion bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten (Gruppe IV)

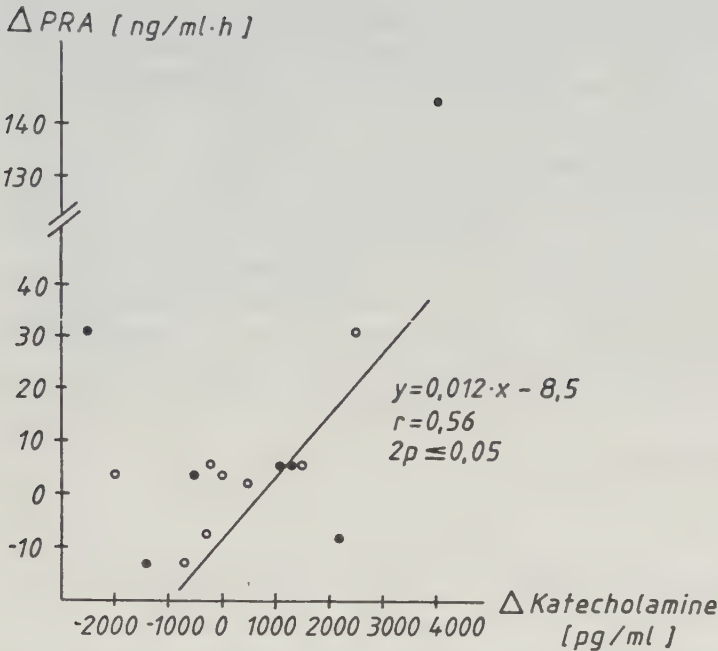


Abb. 43: Beziehung zwischen der Änderung der Plasma-Renin-aktivität (PRA) in Abhängigkeit von der Änderung der Plasma-Katecholamine (●=Noradrenalin, ○=Adrenalin) nach 45 Minuten Phenoxybenzamin-Infusion bei NaCl-reich ernährten Ratten (Gruppe IV)

Beziehung kann bei Gruppe V, die NaCl-arm ernährt wurde, nicht mehr beobachtet werden. Ferner ist für die Änderung der PCEA in beiden Gruppen kein Zusammenhang zur Änderung der Katecholamine feststellbar.

Da die Niere, insbesondere die Nierenrinde mit ihren Glomeruli, als der Hauptsyntheseort für das im Plasma zirkulierende Renin angesehen werden kann, und sie ferner über ein iso-Enzym des A I-Converting enzymes verfügt, wurde untersucht, ob zwischen den im Plasma bestimmten Parametern und denen

der Nierenrinde gegenseitige Interaktionen bestehen. Es interessierte hier auch insbesondere, ob eine Abhängigkeit besteht zwischen den Plasma-Katecholaminen und der NRC und INCEA im Nierenrindenhomogenat.

Bei der Auftragung der PCEA gegen die NRC fand sich eine signifikante ($2p \leq 0,01$) Korrelation in der Weise, daß eine hohe NRC zu einer eher niedrigen PCEA führt und umgekehrt (Abb. 44). Alle übrigen Beziehungen (NRC/PRA, INCEA/PCEA, INCEA/PRA, NRC/INCEA) lassen keine signifikanten Abhängigkeiten erkennen. Bei der Auftragung der INCEA gegen die PRA könnte man allerdings bei Gruppe I (Kontrollgruppe), II (Phenoxybenzamin-Inf.) und IV (Phenoxybenzamin-Inf., NaCl-

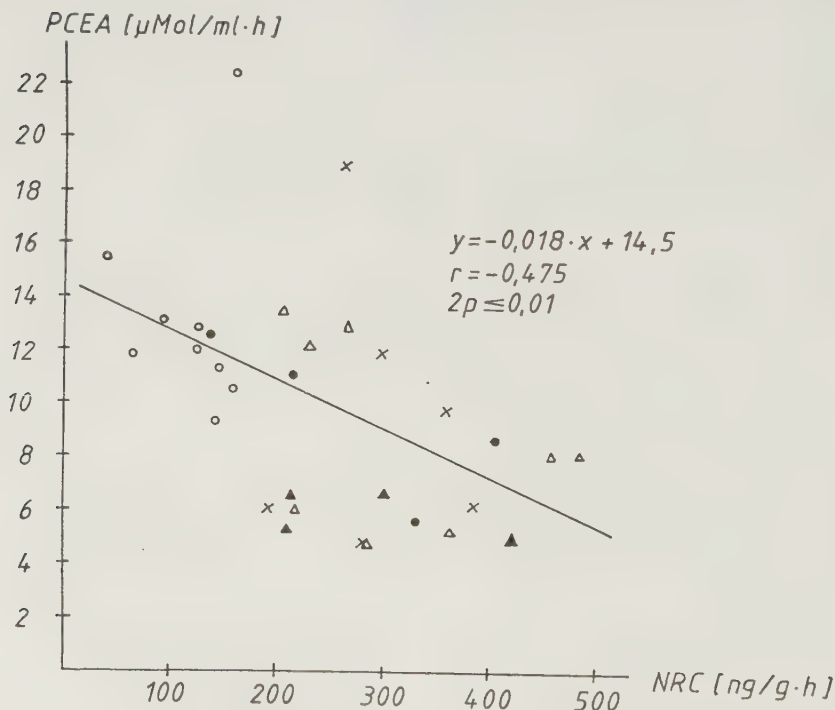


Abb. 44: Beziehung zwischen der Plasma-Converting enzyme-Aktivität (PCEA) und der Reninkonzentration im Nierenrindenhomogenat (NRC)

Legende siehe Abb. 45

Ratten nach Alpha-Blockade. Ein ähnliches Verhalten erkennt man für den Noradrenalin Spiegel und INCEA bei der gleichen Versuchsgruppe. In beiden Fällen geht ein hoher Adrenalin-, bzw. Noradrenalin Gehalt des Plasmas mit einer niedrigen NRC bzw. INCEA einher und umgekehrt. Dagegen ist bei Gruppe V, die NaCl-arm ernährt wurde und zusätzlich Saralasin erhielt, keine Beziehung erkennbar, weder für die NRC noch die INCEA.

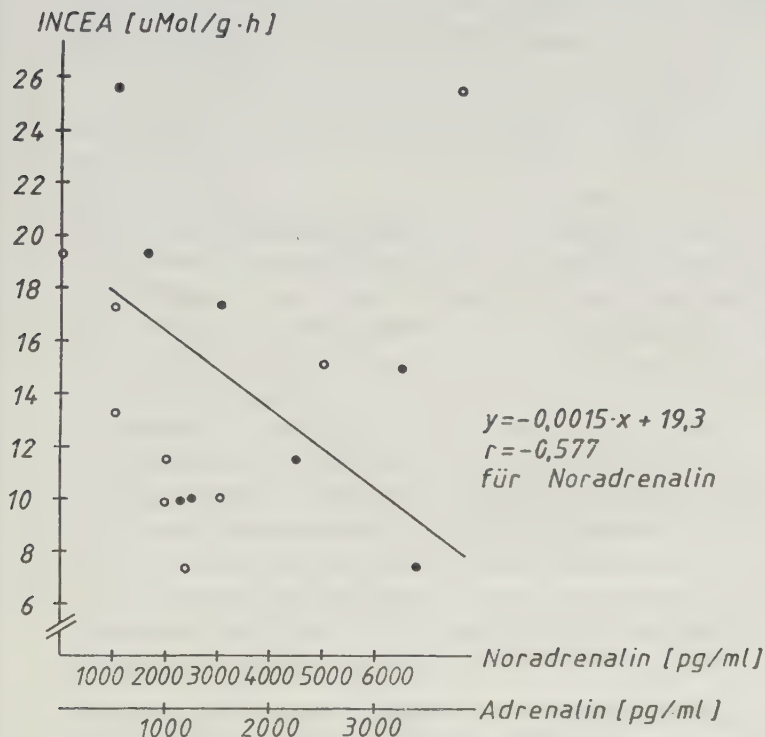
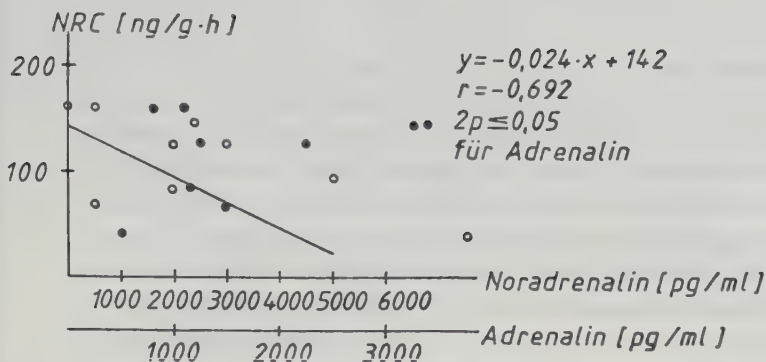


Abb. 46: Beziehung zwischen der Plasma-Noradrenalin- (•), bzw. Adrenalin-konzentration (◦) und der Reninkonzentration (oben), bzw. der iso-Converting enzyme-Aktivität (unten) in der Nierenrinde bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten nach Phenoxybenzamin-Infusion (Gruppe IV)

D. DISKUSSION

Zwischen dem RAS und dem SAS bestehen einige Verbindungen. Solche Interaktionen fand man einerseits für das Renin, auf das das SAS einen stimulierenden Einfluß im Sinne einer erhöhten Freisetzung ausübt, ferner auch für das A II, das fördernd einwirkt auf die Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark und das zu einer Erhöhung der Katecholaminkonzentration im synaptischen Spalt nach Nervenreizung führt. Außerdem besitzt das A II zentral vermittelte Wirkungen auf den Sympathikotonus.

Eine weitere wichtige Komponente im RAS stellt das Converting enzyme dar. Auch für dieses Enzym scheint eine Interaktion mit dem SAS vorzuliegen, wie renale Denervierungsversuche (26) und Infusionsversuche mit Katecholaminen (78) belegen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Verhalten einzelner Komponenten des RAS (Renin, A I-CE) in Niere und Plasma nach Mobilisierung des SAS zu beobachten. Dazu diente uns die Applikation des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin, dessen Infusion bei entsprechender Dosierung bei jedem einzelnen Versuchstier eine Art Schockreaktion hervorrief. Das Verhalten der Renin- und Converting enzyme-Aktivität in Plasma und Niere wurde unter Kontrollbedingungen, unter Alphablockade und unter zusätzlicher A II-Blockade untersucht. Da es Hinweise für ein eigenständiges renales iso-CE gibt, galt diesem Enzym ein besonderes Interesse. Sämtliche Untersuchungen wurden sowohl an normal ernährten als auch 14 Tage NaCl-reich bzw. 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten durchgeführt.

Bei der Ausarbeitung der Versuchsergebnisse wurde vornehmlich auf folgende Punkte geachtet:

1. Wie verhalten sich Blutdruck, Herzfrequenz, PRA, PCEA, NRC und INCEA unter Kontrollbedingungen, unter Alpha-Blockade,

unter A II-Blockade und unter kombinierter Gabe von Phenoxybenzamin und Saralasin?

2. Bestehen Korrelationen zwischen Parametern aus dem SAS, d.h. Blutdruck, Herzfrequenz und Katecholamine mit solchen aus dem SAS, nämlich PRA, PCEA, NRC und INCEA?

3. Sind Änderungen einer Komponente des RAS allein auf Grund der Änderung eines anderen Parameters aus eben diesem System bedingt? Bestehen Korrelationen zwischen dem Plasma-RAS und dem renalen RAS?

4. Lassen sich auf Grund der durchgeführten Untersuchungen weitere Hinweise finden für eine Einflußnahme des SAS auf das Plasma-CE, bzw. renale iso-CE?

Charakterisierung und Wirkungsmechanismus des A II-Antagonisten Saralasin und des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin:

Saralasin unterscheidet sich von dem menschlichen Oktapeptid Angiotensin II durch 3 Aminosäuren. Dabei ist für die Wirkung des A II die Aminosäure Phenylalanin in Position 8 von entscheidender Bedeutung: Durch Austausch dieser Aminosäure mit Alanin bewahrt dieses Peptid zwar weiter seine Affinität zum A II-Rezeptor, führt aber kaum zu einer Erregung dieses Rezeptors. Durch Veränderung der Aminosäuresequenz in Position 1 -Asparaginsäure gegen Sarkosin gewinnt das Peptid weitere antagonistische Wirkung. Die Aminosäure Valin in Position 5 stellt nur eine von 2 natürlich vorkommenden Varianten des A II dar.

Saralasin ist ein kompetitiver Antagonist des A II, wobei ihm allerdings auch eine gewisse intrinsische Aktivität zugeschrieben wird. Die pharmakologische Halbwertszeit für Saralasin wird bei 4 - 8 Minuten angegeben (80).

Phenoxybenzamin ist ein nicht-kompetitiver Antagonist auf Grund seiner Alkylierung der Alpha-Rezeptorenstruktur mit langer Wirkungsdauer (34). An der postganglionären sympathischen Synapse werden 2 Typen von Alpha-Rezeptoren

unterschieden: Alpha₁- und Alpha₂-Rezeptor-Subtypen. Eine Unterteilung der Alpha-Rezeptoren in diese beiden Subtypen erfolgt auf Grund der unterschiedlichen Affinität von agonistisch und antagonistisch wirkenden Substanzen. Die Gliederung in Alpha₁- und Alpha₂-Rezeptor-Subtypen ist allerdings nicht mit einer Differenzierung in prä- und post-synaptisch verbunden. Phenoxybenzamin soll sowohl Alpha₁- als auch Alpha₂-Rezeptoren hemmen (38,42,48,53), d.h. also es hemmt die Übermittlung sympathischer Impulse auf das Effektororgan durch Blockade der postsynaptischen Alpha-Rezeptoren und es fördert ferner die Noradrenalinfreisetzung nach nervaler Reizung auf Grund seiner Blockade der prä-synaptisch lokalisierten Alpha-Rezeptoren (über diese Rezeptoren wird normalerweise eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung vermittelt) (54).

Da das SAS über Alpha-Rezeptoren auf das Gefäßsystem eine vasokonstringierende Wirkung ausübt, führt die Applikation des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin zu einer Vasodilatation vornehmlich in der an Alpha-Rezeptoren reichen Gefäßperipherie. Diese Weitstellung der Gefäße führt zu einem Blutdruckabfall, was seinerseits wiederum zu einer Mobilisierung des SAS führt, ersichtlich z.B. an einem Anstieg der Herzfrequenz.

Diesen signifikanten Blutdruckabfall nach Alpha-Blockade beobachten wir sowohl bei normal (Gruppe II) als auch bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten (Gruppe IV). Parallel dazu kommt es zu einem Anstieg der Herzfrequenz, der allerdings bei Gruppe II (normal ernährt) nicht statistisch signifikant ist, wohl bedingt dadurch, daß ein Versuchstier mit einem starken Abfall der Herzfrequenz (-80/min) reagierte. Vielleicht litt dieses Tier an einer Insuffizienz des SAS, so daß es nicht zu einem Anstieg der Herzfrequenz kam. Die beobachtete Tachykardie ist als eine Art Reflexantwort auf die periphere Vasodilatation zu verstehen. Die auffällige

Erhöhung der Herzfrequenz bei Gruppe IV (NaCl-reich ernährt) bereits nach Infusion von 0,9% NaCl-Lösung könnte als eine Art Streßantwort auf die diätetische Belastung interpretiert werden.

Erstaunlicherweise führt die alleinige Infusion von Saralasin bei normal ernährten Ratten (Gruppe III) auch zu einem signifikanten Blutdruckabfall, obwohl allgemein angenommen wird, daß das RAS an der Regulation des normalen Blutdrucks nicht beteiligt sein sollte. Dieses Phänomen haben wir auch in früheren Versuchen beobachtet (82). Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, daß bereits alleine durch die Anästhesie die Reninsekretion erhöht werden kann (10, 23, 70). Ferner kommt es unter alleiniger Saralasin-Infusion zu einem initialen Blutdruckanstieg, wie er auch von anderen Autoren beobachtet wurde (46, 80). Zur Diskussion stand dafür eine Erhöhung der Plasma-Katecholamine durch das Saralasin. So fanden Mc Grath (57) und Vlachakis (97) eine deutliche Erhöhung des Plasma-Noradrenalins während dieses initialen Blutdruckanstiegs, während Bönner (13) und Carey (19) keine Erhöhung feststellen konnten. Denkbar wäre auch, daß zu Beginn der Infusion die agonistische Aktivität des Saralasins zur Geltung kommt. Wird Saralasin und Phenoxybenzamin kombiniert infundiert (Gruppe III und Gruppe V), so bewirkt dies keinen stärkeren Abfall des Blutdrucks als unter alleiniger Phenoxybenzamin-Infusion (Gruppe II, siehe Abb. 21). Da die alleinige Phenoxybenzamin-Infusion bereits einen signifikanten Anstieg der PRA bewirkte, sollte man dann nicht unter kombinierter Infusion beider Antagonisten einen noch stärkeren Blutdruckabfall erwarten? An der Bildung von A II ist neben dem Renin auch das CE beteiligt. Steigt nun die Reninaktivität an, so wird ab einem gewissen Zeitpunkt der Sättigungsgrad des CE's für sein Substrat A I erreicht werden. Die Folge ist, daß weniger A II entsteht als man es auf Grund des Anstiegs der PRA erwarten würde, da nun die CEA der limitierende Faktor in der Bildung von A II werden könnte. Unter kombinierter Infusion der beiden Antagonisten

Saralasin und Phenoxybenzamin kommt es zu einem Abfall der CEA (in Gruppe III mit normaler Diät statistisch auffällig, in Gruppe V mit NaCl-armer Diät statistisch signifikant). Dies bedeutet, daß der Sättigungsgrad des CE's für sein Substrat noch wesentlich eher erreicht wird mit der Folge einer geringeren Bildung von A II. Wenn nun weniger A II gebildet wird, wird auch Saralasin weniger seine antagonistische Wirkung entfalten mit der Folge eines geringeren Blutdruckabfalls (siehe auch Abb. 38). Ein weiterer Grund für den fehlenden stärkeren Blutdruckabfall bei zusätzlicher Saralasin-Infusion könnte daran liegen, daß die verwendete Saralasindosierung nicht suffizient genug war alles A II aus seiner Rezeptorbindung zu verdrängen.

Während es bei alleine mit Phenoxybenzamin behandelten Ratten (Gruppe II und IV) zu einem reflektorischen Anstieg der Herzfrequenz kommt, kann diese Reaktion bei zusätzlich mit Saralasin infundierten Ratten (Gruppe III und V) nicht mehr beobachtet werden, obwohl auch hier der Blutdruck in gleicher Weise abfällt. Es fällt ferner auf, daß schon während der alleinigen Saralasin-Infusion die Herzfrequenz unverändert bleibt, trotzdem auch hier der Blutdruck in signifikanter Weise abfällt. Auch Hollenberg (45) konnte unter i.v.-Gabe von Saralasin bei NaCl-arm ernährten Hasen keinen Anstieg der Herzfrequenz trotz Abfall des arteriellen Blutdrucks beobachten. Zu dem gleichen Ergebnis kam auch Liebau (55) bei Hypertonikern nach NaCl-armer Diät. Ähnliche Ergebnisse wurden gefunden, wenn das RAS an anderer Stelle blockiert wurde, nämlich bei Gabe eines CE-Inhibitors. Trotz eines entsprechenden Blutdruck-Abfalls kam es zu keiner Reflextachykardie (41, 108). Als eine mögliche Ursache für dieses Phänomen wurde eine Einwirkung des A II auf den normalen Barorezeptorenreflex zur Diskussion gestellt. Dabei soll unter NaCl-armer Diät durch die Einwirkung von A II eine Verstellung des "Set-Points" des normalen Barorezeptorenreflexes erfolgen. Das bedeutet, daß es erst bei

entsprechend niedrigeren Blutdruckwerten via Barorezeptorenreflex zu einer Reflextachykardie kommt als dies bei normal ernährten Tieren der Fall wäre (41).

Die von uns bestimmte PRA bei Ratten mit Normaldiät nach Infusion von physiologischer NaCl-Lösung liegt mit einem gemittelten Wert von $62\text{ng/ml}\cdot\text{h}$ ($n=24$) in dem Meßbereich, wie er auch bei früheren Bestimmungen unserer Arbeitsgruppe ermittelt wurde (78, 82). In der Literatur findet man bisweilen allerdings wesentlich niedrigere Werte. Dies kann dadurch bedingt sein, daß unsere Messungen als reaktionskinetische Messungen mit Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit und nicht als Endpunktbestimmung durchgeführt wurden. Voraussetzung einer Endpunktbestimmung ist eine noch ausreichende Menge an Substrat. Eine Substratuntersättigung würde falsche, d. h. zu niedrige Werte liefern. Eine weitere Ursache kann darin liegen, daß unsere Plasmaproben nicht sofort nach Versuchende gemessen wurden, sondern zunächst tiefgefroren und erst später in einer gemeinsamen Meßserie bestimmt wurden. Es ist bekannt, daß das Renin aus einer inaktiven Form -Porenin- in die aktive Form überführt werden kann. Dieser Vorgang ist unter anderem möglich durch eine Inkubation bei -4°C (Kryoaktivierung), wobei ursächlich eine Zerstörung von Proteaseinhibitoren diskutiert wird (69).

Mit $113\text{ng/ml}\cdot\text{h}$ liegt die PRA bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten signifikant höher als bei normal ernährten Tieren. Dieses Ergebnis stimmt überein mit früheren Messungen aus unserer Arbeitsgruppe und mit den Publikationen anderer Autoren (40, 63, 83). Umgekehrt führt eine NaCl-reiche Diät zu einer allerdings nicht signifikanten Erniedrigung der PRA auf $49\text{ng/ml}\cdot\text{h}$. Es fällt hier vor allem eine große Streuung der Meßergebnisse auf. So liegen 2 Werte ($85\text{ng/ml}\cdot\text{h}$, $105\text{ng/ml}\cdot\text{h}$) bereits in dem Bereich von Meßwerten, in dem im Durchschnitt die Reninaktivitäten bei NaCl-armer Diät liegen. Da die NaCl-reiche Diät für die Versuchstiere eine hohe Belastung darstellt -es kommt gelegentlich unter dieser

Diät zum Tod mancher Ratten- ist es durchaus denkbar, daß hier Mechanismen wirksam werden, die dem supprimierenden Effekt der Diät entgegenwirken: so könnte es durch Aktivierung des SAS zu einer vermehrten Reninfreisetzung via Nierennerven und erhöhter Plasma-Katecholamine kommen.

Während die Infusion von physiologischer NaCl-Lösung (Gruppe I) im weiteren Versuchsablauf zu keiner Änderung der PRA führt, kommt es unter der Applikation des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin bei normal ernährten Ratten (Gruppe II) zu einem signifikanten Anstieg der PRA. Dasselbe Ergebnis beobachteten auch Alexandre (3) bei systemischer Applikation von Phenoxybenzamin, ferner Palazzo-Adriano (66) nach intramuskulärer Injektion an Ratten. Eine dosis-abhängige Stimulierung der PRA bei Ratten mit Phenoxybenzamin konnte Meyer (61) zeigen. T. Assaykeen (5) berichtete bei Hunden über einen nochmaligen Anstieg der PRA nach Phenoxybenzamin-Infusion bei bereits laufender Isoproterenol-Infusion. An der isoliert perfundierten Rattenniere fand Vandongen (95) eine Erhöhung der Reninsekretion nach Phenoxybenzamin-Applikation. Mit Phenoxybenzamin konnte er auch den supprimierenden Effekt von Phenylephrin auf die Reninfreisetzung inhibieren (96). Im Gegensatz dazu konnte Zanchetti (100) keine Wirkung auf die Reninaktivität nachweisen bei direkter Infusion in die Nierenarterie bei Katzen. Auch Passo (68) fand keinen Effekt auf die PRA nach Alpha-Blockade bei Hunden. Ebenso beobachtete auch M. Blair (11) keine Änderung der PRA nach Phenoxybenzamin-Infusion bei Hunden unter Konstanthaltung des renalen Perfusionsdruckes.

Bei einem Vergleich solcher Ergebnisse sind immer auch genauestens die einzelnen Versuchsbedingungen zu studieren z. B. bezüglich Speziesunterschiede, der verwendeten Pharmakodosierungen, der Ausgangsbedingungen, der Applikationsform oder der Änderung weiterer Parameter (z.B. Blutdruck).

Für den von uns beobachteten Anstieg der PRA nach Alpha-

Rezeptorenblockade stehen folgende Punkte zur Diskussion:

Durch den Abfall des systemischen Blutdrucks kommt es auch zu einer Abnahme des renalen Perfusionsdruckes. Dies wirkt stimulierend auf die in der afferenten Arteriole gelegenen Barorezeptoren, die ihrerseits wiederum eine vermehrte Ausschüttung von Renin bewirken. Für eine Beteiligung der Barorezeptoren spricht auch die Beobachtung von M. Blair (11), die keine Änderung der PRA erreichte unter Konstanthaltung des renalen Perfusionsdruckes. Andererseits reagierten in unserer Versuchsreihe 2 Ratten mit keiner Änderung des systemischen Blutdrucks. Dennoch kam es auch hier zu einem deutlichen Anstieg der PRA. Weitere mögliche Ursachen müssen daher diskutiert werden. Die Alpha-Rezeptorenblockade führt bei jedem einzelnen Versuchstier zu einer Art Notfallsituation: wegen der vornehmlich in der Peripherie wirksam werdenden Vasodilatation ist die Aufrechterhaltung eines adäquaten systemischen Blutdrucks nur durch massive Stimulation des SAS möglich, ersichtlich z.B. am Anstieg der Herzfrequenz. Sowohl durch vermehrte Reizung der sympathischen Nierennerven als auch durch eine Erhöhung der Plasmakatecholamine, wie es im Übrigen auch von Graham (38) nach Phenoxybenzamin-Infusion bei normal ernährten Ratten festgestellt wurde, kommt es zu einer Stimulierung der Reninsekretion. Das entsprechende Wirkprinzip für diese vermehrte Reninfreisetzung ist in einer Stimulierung der Beta-Rezeptoren an den granulierten Zellen in der Media der afferenten Arteriole zu sehen. Als weitere Ursache der erhöhten PRA darf man auch eine eventuell vorhandene direkte durch Alpha-Rezeptoren vermittelte Wirkung auf die Reninsekretion nicht unberücksichtigt lassen. Da es bei Applikation des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin zu einer Erhöhung der PRA kommt, müßte man dann eine über Alpha-Rezeptoren vermittelte inhibierende Wirkung auf die Reninsekretion postulieren. Zu der gleichen Schlußfolgerung gelangen im Übrigen auch Meurer (59), Vandongen (95) und Meyer (61). Da Phenoxybenzamin kein selektiver prä- oder post-

synaptischer Blocker ist, werden daher auch beide Rezeptortypen gleichermaßen inhibiert. Nun wird aber über präsynaptisch lokalisierte Rezeptoren eine Inhibition der Freisetzung von Noradrenalin aus den Nervenendigungen in den synaptischen Spalt ausgeübt. Bei Blockade dieses Rezeptortyps kommt es daher zu einer vermehrten Noradrenalin-freisetzung nach Nervenreizung. Diese erhöhte synaptische Noradrenalin-Konzentration trägt seinerseits wieder über verstärkte Stimulierung der Beta-Rezeptoren zu einer Erhöhung der Reninsekretion bei. Es ist folglich über Alpha-Rezeptoren eine direkte und indirekte Wirkung auf die Reninfreisetzung denkbar.

Zusammenfassend kann der beobachtete Anstieg der PRA nach Alpha-Blockade durch folgende Ursachen bedingt sein, wobei sich wohl alle Stimuli in ihrer Wirkung mehr oder weniger ergänzen werden:

- die Abnahme des renalen Perfusionsdruckes führt zu einer Reizung der Barorezeptoren
- durch Stimulierung des SAS (Nierennerven, Plasma-Katecholamine) kommt es zu einer über Beta-Rezeptoren vermittelten Steigerung der Reninsekretion
- die Blockade der postsynaptisch lokalisierten Alpha-Rezeptoren bewirkt eine Enthemmung der inhibierenden Wirkung dieser Alpha-Rezeptoren auf die Reninfreisetzung
- durch Antagonisierung der präsynaptisch lokalisierten Alpha-Rezeptoren wird vermehrt Noradrenalin in den synaptischen Spalt freigesetzt, das seinerseits wieder über Beta-Rezeptoren die Reninsekretion fördert.

Bei Ratten mit 14 Tage NaCl-reicher Diät ist dieser Anstieg der PRA unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nicht zu beobachten. Laut Nakane (63) soll Renin in 2 Formen gespeichert werden: als schnell mobilisierbarer und als langsam mobilisierbarer Pool, wobei die Annahme eines langsam mobilisierbaren Pools identisch sein könnte mit der Feststellung eines Renins von hohem Molekulargewicht, des so-

genannten Prorenins. Unter dieser Hypothese soll es unter NaCl-reicher Diät zu einer Abnahme des schnell zur Verfügung stehenden Pools kommen. Es kann also nicht in entsprechender Weise, wie bei normal ernährten Ratten, auf den durch Phenoxybenzamin gesetzten Stimulus Renin freigesetzt werden. Eine weitere Ursache des fehlenden Anstiegs der PRA nach Alpha-Rezeptorenblockade bei Gruppe IV könnte in der erhöhten Rezeptorempfindlichkeit der Gefäße unter NaCl-Belastung liegen (17, 83). Deswegen reichen bereits geringere Mengen von A II aus, um an den peripheren Gefäßen eine adäquate Vasokonstriktion zu erreichen, vermittelt sowohl durch direkte A II-Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur als auch indirekt durch erhöhte Katecholaminfreisetzung in den synaptischen Spalt unter NaCl-reicher Diät induziert durch A II (20).

Die Tiere aus Versuchsgruppe III und V unterscheiden sich von den übrigen Gruppen vornehmlich dadurch, daß ihr RAS zu Beginn der Phenoxybenzamin-Infusion bereits vorstimuliert war. Einmal wurde dies durch alleinige Saralasin-Infusion erreicht (Gruppe III), zum anderen durch eine zusätzliche NaCl-arme Diät (Gruppe V). Wie erwartet kommt es bei normal ernährten Ratten zu einem signifikanten Anstieg der PRA unter Saralasin-Infusion, was wohl vornehmlich auf die Blockierung des A II-Renin-Feedbackmechanismus zurückzuführen ist. Dieser Mechanismus funktioniert in der Weise, daß A II über entsprechende Rezeptoren in der Lage ist die Reninsekretion zu blockieren. Durch Antagonisierung der A II-Rezeptoren mittels Saralasin wird dieser Rückkopplungsmechanismus gestört (80). Dieser Anstieg der PRA wird noch wesentlich verstärkt bei Ratten, die eine 14-tägige NaCl-arme Diät erhielten (Gruppe V). Auch hier dürfte die Unterbrechung des Feedback-Mechanismus eine wesentliche Rolle spielen. Zum anderen kommt es dabei auch zu einem größeren Abfall des systemischen Blutdrucks als bei Vergleichsgruppe III, was seinerseits wiederum sowohl durch Stimulierung der Barorezeptoren als auch durch Aktivierung des SAS zu einer vermehrten Reninfreisetzung führt. Eine

nochmalige Stimulierung der PRA mittels zusätzlicher Phenoxybenzamin-Infusion, wie bei Gruppe III, ist bei Gruppe V allerdings nicht mehr zu erreichen. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte darin liegen, daß durch die vorausgegangene alleinige Saralasin-Infusion die intrarenalen Reninspeicher bereits so weitgehend entleert waren, daß eine weitere Mobilisierung von Renin durch den mit Phenoxybenzamin gesetzten Reiz nicht mehr möglich war, Bezeichnend dafür ist auch die Tatsache, daß es bei 3 Versuchstieren, die mit den stärksten Reninanstieg unter alleiniger Saralasingabe reagierten, es anschließend bei zusätzlicher Alpha-Rezeptorenblockade sogar zu einem deutlichen Abfall der PRA kommt.

Während sich die Basalwerte der PCEA bei Gruppe I, II und III (alle normal ernährt) nach 15 Minuten NaCl-Infusion nicht signifikant voneinander unterscheiden, liegt die PCEA bei Gruppe IV (14 Tage NaCl-reich ernährt) mit einem gemittelten Wert von $18,9 \mu\text{Mol/ml}\cdot\text{h}$ signifikant höher. Zu demselben Ergebnis kamen auch Allen und Gillmore (1) bei Hunden mit 14 Tage NaCl-reicher Diät. Umgekehrt beobachteten sie aber auch nach 14 Tagen NaCl-armer Diät eine Erniedrigung der PCEA, während sich in unserer Versuchsreihe bei Gruppe V (NaCl-arme Diät) die PCEA nicht signifikant von der PCEA normal ernährter Tiere unterscheidet. Auch Kurihara (52) fand bei Hasen nach NaCl-armer Diät keine Änderung der PCEA. Ohne Effekt auf die PCEA blieb eine diätetische Behandlung (NaCl-arm, normal, NaCl-reich) in einer Versuchsreihe von Molteni (62). Diese Diskrepanzen könnten einmal bedingt sein durch Speziesunterschiede, ferner durch unterschiedliche Dosierungen der NaCl-Diäten. Auch die zeitliche Dauer der diätetischen Vorbehandlung scheint eine wesentliche Rolle zu spielen.

Während die alleinige Infusion des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin bei normal ernährten Ratten (Gruppe II) zu

keiner Änderung der PCEA führt, kommt es bei Ratten mit 14 Tage NaCl-reicher Diät (Gruppe IV) , bei denen die Ausgangs-PCEA bereits signifikant erhöht war, zu einem signifikanten Abfall der PCEA. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte darin liegen, daß die PCEA bereits vor Versuchsbeginn durch die NaCl-reiche Diät vorstimuliert war, so daß sie auf exogen induzierte Reize deutlicher reagiert. Dafür spricht auch die Korrelation aus Abb. 29, die besagt, daß die PCEA umso stärker abfällt, je höher die Ausgangs-PCEA ist.

Durch die alleinige Saralasin-Infusion läßt sich sowohl bei normal (Gruppe III) als auch NaCl-arm ernährten Ratten (Gruppe V) kein eindeutiger Effekt auf die mittlere PCEA erreichen. Die PCEA -bei jedem einzelnen Versuchstier betrachtet- reagiert allerdings teilweise sowohl mit einem Anstieg als auch einem Abfall. Eine Ursache für diese unterschiedliche Reaktion ließ sich mit den von uns bestimmten Parametern nicht finden, wobei eine Meßungenauigkeit ausgeschlossen werden kann: Weder bestand eine Korrelation zu den PRA-Spiegeln noch zu Änderungen der PRA, noch zu Blutdruck- oder Herzfrequenzveränderungen. Andere Fakten müssen hier noch eine Rolle spielen. Eventuell liegt der Grund bei den von uns nicht bestimmten Bradykinin-Spiegeln. Fagard (33) fand bei hypertensiven Patienten keine Änderung der PCEA unter Saralasin-Gabe, während Salama (82) mit i.v.-Gabe von Saralasin an Ratten eine statistisch auffällige Erhöhung der PCEA erreichen konnte. Allerdings wurde hier die PCEA erst nach einer Stunde Saralasin-Infusion gemessen, so daß die gesamt applizierte Menge doch erheblich höher war. Zur eingehenden Klärung einer durch Saralasin induzierten Änderung der PCEA wären genaue Dosis-abhängige Bestimmungen der PCEA notwendig.

Durch die zusätzliche Applikation des Alpha-Rezeptoren-blockers kommt es bei Gruppe III (normal ernährt) zu einen statistisch auffälligen, bei Gruppe V (NaCl-arm ernährt) zu

einem signifikanten Absinken der PCEA. 2 Tatsachen verdienen hier besonderes Interesse: 1. fällt die PCEA -bei jedem einzelnen Versuchstier betrachtet- auch dann ab, wenn sie unter alleiniger Saralasingabe angestiegen ist und 2. reagiert die PCEA umso stärker, je höher die Ausgangs-PCEA vor Alpha-Blockade war.

Versucht man die gefundenen Ergebnisse auf einen Nenner zu bringen, so wäre durchaus folgende Konstellation denkbar: die PCEA kann über Alpha-Rezeptoren, sei es nun direkt oder indirekt, stimulierend beeinflusst werden. Da das CE in den Gefäßwänden lokalisiert ist (32), wäre schon von morphologischer Seite eine Wechselwirkung denkbar. Diese positive Einflußnahme kann durch Applikation des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin antagonisiert werden. Allerdings ist dies nur dann möglich, wenn durch die Alpha-Rezeptoren auch wirklich ein stimulierender Effekt auf die PCEA ausgeübt wird (ersichtlich am besonders ausgeprägten Abfall der PCEA bei hoher Ausgangs-PCEA). Eine Blockade von Alpha-Rezeptoren, die sich im Ruhetonus befinden, kann keine Wirkung auf die PCEA auslösen (so z.B. bei Gruppe II und bei Ausgangswerten mit niedriger PCEA, siehe Abb. 29). Für diese Hypothese sprechen auch die Ergebnisse von Richter (78), der nach i.v.-Applikation sowohl von Adrenalin als auch Noradrenalin eine Erhöhung der PCEA erzielte.

Es fällt ferner auf, daß eine hohe PCEA mit einer eher niedrigen PRA einhergeht und umgekehrt. Eine ähnliche Beziehung wurde auch von Schweisfurth (27) gefunden, allerdings nicht für das im Plasma vorhandene CE, sondern das in der Nierenrinde nachweisbare CE. Es war eine hohe glomeruläre CEA mit einer niedrigen PRA korreliert und umgekehrt. Wäre es nicht denkbar, daß neben den A II-Renin-Feedback-Mechanismus noch ein weiterer Regelkreis existiert? Dieser könnte im Sinne einer Vorwärtshemmung funktionieren mit dem Ziel überschießende A II-Spiegel zu verhindern. Das Renin, oder auch A I, müßte sich demnach ab einer bestimmten Höhe hemmend auf das CE auswirken. Dies würde er-

klären, warum hohe Reninspiegel mit niedriger CEA einhergehen und umgekehrt. Eine Korrelation zwischen Renin und CE konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich zur PRA bzw. PCEA wurden bei NaCl-reich und NaCl-arm ernährten Tieren noch die beiden Plasma-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin bestimmt. Es fällt dabei eine große Streuung der ermittelten Katecholaminkonzentrationen auf, die vor allem nach 15 Minuten NaCl-Infusion, also eher zu Beginn der Infusionsversuche, besonders ausgeprägt ist. Bei zukünftigen Versuchen müßte darauf geachtet werden, daß 1. die Meßgenauigkeit für die Katecholaminbestimmung noch weiter optimiert wird, 2. die Versuchsbedingungen von Tier zu Tier so weit als möglich übereinstimmen (gleiche Tageszeit, gleiche Umgebungstemperatur, Verwendung von Geschwistertieren etc.) und 3. die Tiere so wenig als möglich unter Streß stehen. Insbesondere sollte darauf geachtet werden, daß zwischen der operativen Versuchsvorbereitung der Ratten und der ersten Blutabnahme eine mindestens 30-minütige Infusionsperiode mit physiologischer Kochsalzlösung eingeschaltet wird. Denn offensichtlich hatten einige Versuchstiere die Streßbedingungen von Anästhesie, Operation etc. noch nicht überwunden, was die besonders hohe Streuung nach 15 Minuten NaCl-Infusion mit erklären könnte.

Beim Vergleich der gemessenen Werte nach 15 Minuten NaCl-Infusion konnte zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Carruba (21) fand hier bei NaCl-reich ernährten Ratten nach einer Woche Diätdauer keine Änderung der Noradrenalinkonzentration, nach 5 Wochen allerdings eine signifikante Erniedrigung der Plasma-Noradrenalinkonzentration. Genau eine gegensätzliche Wirkung, nämlich eine Erhöhung der Plasma-Katecholamine, beobachtete De Champlain (22) bei Ratten unter NaCl-Belastung. Keine Änderung des Noradrenalinpiegels bei Hunden erreichte Carriere (20) nach 10-tägiger NaCl-reicher Diät. Bei NaCl-arm ernährten Hunden über einen Zeitraum von 3 Wochen stellte

Brosnihan (104) eine signifikante Erhöhung der Plasma-Noradrenalin-konzentration fest, während die Adrenalin-konzentration unverändert blieb. Da in unserer Versuchsreihe ein Bezugswert zu normal ernährten Tieren fehlt, ist ein Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Werten nur schwer möglich. Insgesamt gesehen scheint allerdings auch hier -wie bei der PCEA- die Dauer der Diät doch eine wesentliche Rolle zu spielen.

Unter Alpha-Blockade kommt es sowohl bei NaCl-reich, als auch NaCl-arm ernährten Ratten, denen zusätzlich noch Saralasin mitinfundiert wurde, zu einer auffälligen, wenn auch nicht signifikanten Erhöhung der Plasma-Noradrenalin-konzentration. Die Adrenalin-konzentration steigt nur bei Gruppe V mit NaCl-ärmer Diät an. Auch Kopin (50) und Bigelow (9) konnten nach intraperitonealer Instillation von Phenoxybenzamin bei Ratten einen Anstieg der Plasma-Katecholamine bzw. eine erhöhte Ausscheidung im Urin beobachten. Als Ursache sind folgende Mechanismen denkbar: Auf Grund der postsynaptischen Rezeptorenblockade kommt es zu einer Art Reflexaktivierung des SAS mit vermehrter Freisetzung von Noradrenalin sowohl am synaptischen Spalt als auch aus dem Nebennierenmark. Ferner werden durch Phenoxybenzamin auch die präsynaptischen Rezeptoren blockiert, von denen aber bekannt ist, daß sie einen inhibierenden Effekt auf die Noradrenalin-freisetzung nach Nervenfreisetzung in den synaptischen Spalt ausüben. Durch Hemmung der im ZNS lokalisierten Alpha-Rezeptoren wird schließlich auch von Zentral her ein erhöhter sympathischer Outflow herbeigeführt (42). Auch eine durch A II induzierte Freisetzung von Katecholaminen sowohl an den adrenergen Synapsen als auch aus dem Nebennierenmark ist mit in Erwägung zu ziehen. Unter einer Infusion von A II beobachteten sowohl Rowe (81) an Kaninchen als auch Carriere (20) an NaCl-reich ernährten Hunden einen Anstieg der Katecholamine. Insgesamt gesehen wird dieser A II-induzierte Freisetzungsvorgang aber wohl nicht von erheblicher Bedeutung sein, da bei NaCl-reich ernährten

Tieren (Gruppe IV) das RAS ja supprimiert ist -auch die PCEA fällt nach zunächst erhöhten Werten ab- und bei der NaCl-arm ernährten Gruppe V zusätzlich noch Saralasin mit- infundiert wurde. Der unter alleiniger Saralasin-Infusion beobachtete Noradrenalinanstieg -dieselbe Wirkung konnte im übrigen auch Carruba (21) an Ratten und Röckel (79) am Menschen nachweisen- ist wohl am ehesten als reflektori- sche Wirkung auf den Blutdruckabfall zu werten. Aber auch eine gewisse agonistische Wirkung von Saralasin sollte mit berücksichtigt werden.

Zu denen im Plasma bestimmten Komponenten des RAS wurden außerdem noch in der Nierenrinde die Reninkonzentration und die iso-CEA gemessen.

Es zeigte sich, daß durch die 14-tägige NaCl-reiche Diät eine signifikante Erniedrigung der NRC erreicht wurde. Dies steht in Übereinkunft mit früheren Messungen unserer Arbeits- gruppe (37). Auch Nakane (59) und Molteni (58) fanden eine Erniedrigung des Nierenrenins bei Ratten unter NaCl- reicher Diät.

Weder die Applikation von Phenoxybenzamin, noch die zu- sätzliche Infusion von Saralasin führt zu einer Änderung der NRC, im Gegensatz zum Anstieg der Reninaktivität im Plasma. 2 Punkte müssen hier in Erwägung gezogen werden: Zum ersten wäre durchaus denkbar, daß die zeitliche Dauer der Infusion zu kurz war, um die Syntheserate der juxta- glomerulären Zellen in der Weise zu stimulieren, daß die Konzentrationsunterschiede in für uns meßtechnisch er- faßbare Bereiche gelangen. Die biologische Streuung ist hier relativ hoch. Ferner könnte es möglich sein, daß es durch die Freisetzung von Renin in das Plasma zu einer Entleerung der Reninspeicher in der Niere kommt, weswegen dann in der Nierenrinde vermeintlich normale Reninkonzen- trationen festgestellt werden. Der Abfall der PRA unter kombinierter Phenoxybenzamin- und Saralasin-Infusion bei 3 Versuchstieren aus Gruppe V (NaCl-arme Diät) nach anfäng-

lichen erheblichen Anstieg der PRA unter alleiniger Saralasin-Infusion untermauert diese Hypothese. Auch Salama (82) fand in einzelnen isolierten Glomeruli keine Erhöhung des Reningehalts trotz eines signifikanten Anstiegs der PRA nach Saralasin-Infusion.

Bei der Diskussion der NCEA gilt zu berücksichtigen, daß bei der Messung der Enzymaktivität als pH des Inkubationsvolumens 6,0 eingestellt wurde. Dies ist das pH-Optimum für ein in der Nierenrinde vorkommendes iso-CE, das sich vom Plasma-CE durch eine andere Michaelis-Menten-Konstante, anderes Blockierungsverhalten und ferner durch ein anderes pH-Optimum unterscheidet.

Beim Vergleich der einzelnen Gruppen fällt auf, daß die INCEA aus Gruppe V (NaCl-arme Diät) im Vergleich zu Gruppe III (normale Diät; ansonsten gleiche Versuchsbedingungen) wesentlich niedriger liegt. Da sich beide Gruppen nur auf Grund der Diäten unterscheiden, könnte es möglich sein, daß die beobachtete Erniedrigung der INCEA durch die NaCl-arme Diät induziert wurde. Dieses Ergebnis wäre in Übereinstimmung mit früheren Messungen aus unserer Arbeitsgruppe (27, 28, 29). Auch Merrill (58) stellte bei Hunden nach NaCl-armer Diät eine verminderte Konversion von A I zu A II in der Niere fest.

Es gibt Hinweise dafür, daß das renale iso-CE dem Einfluß des vegetativen Nervensystems unterliegt. So führte eine renale Denervierung zu einer signifikanten Abnahme dieses Enzyms (26). Umgekehrt kam es unter temporärer Ischämie (Drosselung der Nierendurchblutung) und unter Stimulierung des SAS durch Hämorrhagie zu einer Zunahme der glomerulären CEA (84). Auch Richter (78) fand nach intravenöser Noradrenalin-Infusion eine Erhöhung des renalen iso-CE's in der Nierenrinde. Nach alleiniger Phenoxybenzamin-Infusion konnten wir keine Änderung der renalen ICEA beobachten, weder bei normal noch NaCl-reich ernährten Ratten. Nach kombinierter Infusion von Phenoxybenzamin und Saralasin fanden wir bei normal ernährten Ratten (Gruppe III) einen

Anstieg der INCEA im Vergleich zu Gruppe II mit alleiniger Phenoxybenzamin-Infusion. Im Plasma kam es hingegen zu einem Abfall der CEA unter kombinierter A II- und Alpha-Blockade. Offensichtlich scheint das renale iso-CE auf die gleichen Stimuli anders zu reagieren als das im Plasma zirkulierende CE. Lokale Änderungen von A II im Nierenrindengewebe mit evtl. direkten Rückwirkungen auf das renale iso-CE könnten hier von Bedeutung sein.

Bei der Ausarbeitung der Versuchsergebnisse wurde ferner insbesondere darauf geachtet, ob zwischen den Komponenten des RAS und denen des SAS evtl. Korrelationen herstellbar sind. Bei Ratten mit NaCl-armer Diät hängt sowohl der diastolische Blutdruck (Abb. 34) -als Indikator des peripheren Widerstands- als auch der mittlere arterielle Blutdruck (Abb. 35), als auch die Herzfrequenz (Abb. 39) in signifikanter Weise von der PRA ab. Unter diesen Bedingungen - nämlich NaCl-arme Ernährung- scheint an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks in wesentlicher Weise das RAS beteiligt zu sein mit stimulierten Renin und daraus zu folgenden stimulierten A II, während das SAS eher eine untergeordnete Rolle spielen soll mit erniedrigten zentralen sympathischen Outflow (15), worin im übrigen auch mit ein Grund dafür gesehen wird, warum es nicht zur Entwicklung eines Hochdrucks kommt. Je niedriger daher der diastolische Blutdruck ist, umso höher muß die PRA ansteigen, um über A II noch einen ausreichenden peripheren Widerstand zu gewährleisten. Das RAS wird aber sicherlich nicht alleine an der Aufrechterhaltung des Blutdrucks beteiligt sein. Der Grund dafür, warum auch für die PCEA keine ähnliche Korrelation besteht, dürfte wohl darin liegen, daß die PCEA keinen limitierenden Faktor in der Bildung von A II darstellt. Unter diesen basalen Bedingungen -nach 15 Minuten NaCl-Infusion- sollte die Höhe des A II-Plasmaspiegels allein von der Höhe der PRA abhängen.

Es fand sich ferner eine signifikante Beziehung zwischen der Änderung des diastolischen Blutdrucks und der Änderung

der PRA (Abb. 37) nach Alpha-Blockade bei NaCl-reich ernährten Tieren. Das Verbindungsglied zwischen beiden Größen könnten evtl. die Plasma-Katecholamine darstellen. Wie aus Abb. 41 ersichtlich wird, steigen die Katecholamine umso stärker an, je mehr der Blutdruck abfällt. Dies ist wohl als gegenregulatorische Maßnahme zur peripheren Vasodilatation -induziert durch die Alpha-Blockade- zu verstehen. Durch die Katecholamine wird nun wiederum eine sekretionsfördernder Reiz auf die Freisetzung von Renin aus dem JGA ausgeübt. Vermittelt wird diese Wirkung durch Stimulierung der Betarezeptoren. Dadurch erklärt sich der Befund aus Abb. 37: Je mehr der diastolische Blutdruck abfällt, desto mehr steigen die Katecholamine an, umso höher ist die PRA.

Bei NaCl-arm ernährten Tieren läßt sich für die PRA kein ähnliches Verhalten feststellen. Mit eine Ursache dürfte wohl in der zusätzlichen Applikation des A II-Antagonisten Saralasin liegen, wodurch es zu einer Unterbrechung des Feedback-Mechanismus kommt. Es besteht allerdings eine signifikante Korrelation zwischen der Änderung des diastolischen Blutdrucks und der Änderung der PCEA nach kombinierter Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion (Abb. 38). Richter (78) fand nach i.v.-Adrenalinapplikation eine lineare Korrelation zwischen der Höhe des diastolischen Blutdrucks und der Höhe der PCEA. Es ist durchaus denkbar, daß die PCEA hier zu einen limitierenden Faktor in der Bildung von A II geworden ist. 2 Fakten sind dafür von Bedeutung: Durch den hohen Anstieg der PRA wird sehr viel A I gebildet, so daß der Sättigungsgrad für die PCEA erreicht wird, wodurch dieses Enzym nun zum Regulatorenzym in der Bildung von A II wird. Diese maximale Ausbelastung der Aktivität des CE's wird noch zusätzlich gefördert durch das Absinken der PCEA unter kombinierter Phenoxybenzamin- und Saralasin-Infusion. Je weiter nun die PCEA abnimmt, umso weniger A II wird gebildet. Die antagonistische Wirkung von Saralasin kommt dadurch umso weniger zur Geltung, weswegen der Blutdruck nicht so stark absinkt. Dies könnte der Grund sein, warum ein starker Abfall

der PCEA mit einer geringen Änderung des diastolischen Blutdrucks einhergeht und umgekehrt.

Bei NaCl-reich ernährten Tieren fanden sich 2 weitere, wenn auch nicht signifikante Beziehungen zwischen dem RAS und dem SAS: Nach 15 Minuten NaCl-Infusion besteht eine Korrelation zwischen der Höhe des Plasma-Noradrenalin-Spiegels und sowohl der Höhe der PRA als auch der PCEA (Abb.42). Dabei führt ein hoher Noradrenalin-Spiegel auch zu einer hohen PRA. Dies könnte induziert werden durch im Bereich des JGA gelegene Beta-Rezeptoren, über die das SAS eine erhöhte Freisetzung von Renin aus den granulierten Zellen der afferenten Arteriole bewirken kann. Daß auch die Höhe der PCEA von der Höhe der Plasma-Noradrenalin-Konzentration abzuhängen scheint, steht in Übereinkunft 1. mit den Ergebnissen von Richter (78), der nach i.v.-Applikation von Noradrenalin und Adrenalin eine Stimulierung der PCEA erzielte und 2. mit der Beobachtung aus dieser Arbeit, daß es unter Alpha-Blockade zu einer Erniedrigung der PCEA kam.

Ein weiteres besonderes Augenmerk galt den in der Nierenrinde bestimmten Parametern, hier insbesondere in Bezug gesetzt zu den im Plasma gemessenen Werten. Salama (82) hatte sich mit dieser Thematik bereits sehr eingehend befaßt.

Eine signifikante Beziehung zeigte sich zwischen der PCEA und der NRC in der Weise, daß eine hohe NRC zu einer niedrigen PCEA führt (Abb. 44). Es wäre durchaus denkbar, daß das Renin, oder auch sein Reaktionsprodukt A I, im Sinne einer Substrathemmung ab einer bestimmten Konzentration einen inhibierenden Effekt auf die PCEA ausübt. Ferner fand sich beim Vergleich der INCEA mit der PRA ein Trend dahingehend, daß eine hohe INCEA mit einer niedrigen PRA einhergeht.

Eine signifikante Beziehung zwischen der INCEA und der PRA wurde bereits bei früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (27) gefunden. Es wurde postuliert, daß die NCEA zu einer lokalen Bildung von A II führt, das bekanntlich eine inhibierende Wirkung auf die Reninfreisetzung ausübt (kurzer Feedback-Mechanismus).

Beim Vergleich der Plasma-Katecholamine mit der NRC bzw. der INCEA fällt auf, daß es bei NaCl-reich ernährten Tieren mit zunehmender Katecholaminkonzentration zu einer Abnahme der NRC bzw. der INCEA kommt. Da durch die Katecholamine eine vermehrte Freisetzung von Renin aus den Renin-produzierenden Zellen in die Blutbahn induziert werden kann, führt eine Zunahme der Plasma-Katecholamine zu einer Reninverarmung der Niere. Das aus der Niere freigesetzte Renin findet sich dann im Plasma wieder (siehe Abb. 42). Daß sich diese Korrelation vornehmlich für das Adrenalin findet, könnte daran liegen, daß das Adrenalin eine vermehrte Affinität zu Beta-Rezeptoren besitzt. Schwieriger zu verstehen ist das Ergebnis der INCEA, zumal da von Natcheff (26) nach Nierendeneravierung eher ein Absinken der glomerulären iso-CEA beobachtet wurde. Unter der Annahme, daß neben der PCEA auch die INCEA durch Alpha-Rezeptoren aktiviert werden kann, wäre folgender Mechanismus denkbar: Bei hohen Katecholaminspiegeln wird die INCEA mehr stimuliert als bei niedrigen Werten. Die Alpha-Rezeptorenblockade wirkt sich demnach auch stärker aus, deswegen kommt es zu einer eher niedrigen INCEA bei hohen Plasma-Noradrenalkonzentrationen und umgekehrt. Weitere eingehende Untersuchungen sind allerdings notwendig um dies zu bestätigen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Zwischen dem RAS und dem SAS bestehen einige Verbindungen. Solche Beziehungen fand man sowohl für das Renin als auch für das A II. Eine weitere wichtige Komponente des RAS stellt das CE dar. Auch für dieses Enzym liegen Untersuchungsergebnisse vor, die eine Wechselwirkung mit dem SAS wahrscheinlich machen.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Verhalten einzelner Komponenten des RAS (Renin, A I-CE) im Plasma und Nierengewebe der Ratte nach Mobilisierung des SAS untersucht werden. Die Infusionsversuche haben wir sowohl bei normal ernährten als auch 14 Tage NaCl-reich, bzw. 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten vorgenommen.

Durch die Applikation des Alpha-Rezeptorenblockers Phenoxybenzamin kam es zu einem signifikanten Abfall des systolischen und des diastolischen Blutdrucks in sämtlichen Versuchsgruppen. Auch die alleinige A II-Rezeptorenblockade mit Saralasin führte zu einem signifikanten Blutdruckabfall sowohl bei normal als auch 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten. Die Herzfrequenz zeigte einen Anstieg auf die alleinige Alpha-Rezeptorenblockade bei normal als auch NaCl-reich ernährten Tieren. Dahingegen kam es zu keiner Herzfrequenzerhöhung, wenn zusätzlich noch zu Phenoxybenzamin Saralasin mitinfundiert wurde.

Die PRA lag nach 15 Minuten NaCl-Infusion bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Ratten signifikant höher als bei normal ernährten Ratten. Die Infusion von Phenoxybenzamin führte zu einer signifikanten Erhöhung der PRA bei normal ernährten Tieren. Bei NaCl-reich ernährten Tieren blieb die PRA nach Alpha-Rezeptorenblockade allerdings unverändert. Die alleinige Saralasininfusion bewirkte sowohl bei normal ernährten als auch 14 Tage NaCl-arm ernährten Tieren eine signifikante Erhöhung der PRA. Wurde bei diesen beiden Versuchsgruppen zusätzlich noch Phenoxybenzamin infundiert, so kam es zu einem weiteren Anstieg der PRA bei normal ernährten Tieren, wäh-

rend die PRA bei der NaCl-arm ernährten Versuchsgruppe unverändert blieb.

Nach 14 Tagen NaCl-reicher Diät lag die PCEA signifikant höher als bei normal ernährten Tieren. Durch die Phenoxybenzamin-Infusion kam es bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Tieren zu einen signifikanten Abfall der PCEA. Unter der kombinierten Gabe von Phenoxybenzamin und Saralasin fanden wir bei normal ernährten Tieren eine statistisch auffällige und bei NaCl-arm ernährten Ratten eine signifikante Erniedrigung der PCEA. Der Abfall der PCEA nach Alpha-Rezeptorenblockade war in signifikanter Weise korreliert zur Höhe der PCEA vor Alpha-Blockade.

Bei den Plasma-Katecholaminen fanden sich keine signifikanten Änderungen, wobei die biologische Streubreite allerdings verhältnismäßig hoch war. Auffällig war eine Erhöhung der Plasma-NoradrenalinKonzentration nach alleiniger Alpha-Rezeptorenblockade bei der NaCl-reich ernährten Gruppe als auch nach kombinierter Phenoxybenzamin- und Saralasininfusion bei der NaCl-arm ernährten Gruppe.

In der Nierenrinde zeigte sich nach Alpha-Blockade eine statistisch auffällige Erniedrigung der NRC bei 14 Tage NaCl-reich ernährten Ratten im Vergleich zu normal ernährten Tieren nach Alpha-Blockade. Bei der INCEA fiel bei normal ernährten Ratten nach kombinierter Saralasin- und Phenoxybenzamin-Infusion eine Erhöhung auf im Vergleich zur Gruppe mit alleiniger Phenoxybenzamin-Infusion.

Mittels Regressionsrechnung wurde ein evtl. gegenseitiges Abhängigkeitsverhältnis zwischen den einzelnen Parametern untersucht. Geachtet wurde dabei vornehmlich auf Wechselwirkungen zwischen dem RAS und dem SAS und ferner zwischen dem Plasma-RAS und dem renalen RAS. Nach 15 Minuten NaCl-Infusion fand sich bei 14 Tage NaCl-arm ernährten Tieren eine signifikante Korrelation zwischen PRA und diastolischen Blutdruck, bzw. mittleren Blutdruck, ferner zwischen PRA und Herzfrequenz. Bei der NaCl-reich ernährten Gruppe war der Abfall des diastolischen Blutdrucks nach Alpha-Rezeptoren-

blockade signifikant abhängig zum Anstieg der PRA nach Phenoxybenzamin-Infusion. Ebenso war die Änderung der PRA in dieser Versuchsgruppe in statistisch auffälliger Weise korreliert zur Änderung der Plasma-Katecholamine nach Alpha-Blockade. Der Abfall der PCEA nach kombinierter Phenoxybenzamin- und Saralasin-Infusion bei NaCl-arm ernährten Tieren zeigte eine signifikante Beziehung zur Änderung des diastolischen Blutdrucks in dieser Versuchsgruppe. Statistisch auffällig korreliert war ferner die Änderung der Katecholamine zur Änderung des Blutdrucks nach Alpha-Rezeptorenblockade bei NaCl-reich ernährten Ratten. Im Nierenrindenhomogenat zeigte sich bei NaCl-reich ernährten Tieren eine statistisch auffällige Beziehung zwischen der NRC und der Plasma-Adrenalin-konzentration, bzw. der INCEA und der Plasma-Noradrenalin-konzentration. Außerdem war die PCEA in signifikanter Weise linear abhängig von der NRC.

Wie die ermittelten Ergebnisse zeigen, scheint neben dem Renin und Angiotensin II auch das Converting enzyme dem Einfluß des vegetativen Nervensystems zu unterliegen. Dies wird besonders dann deutlich, wenn die einzelnen Parameter des RAS stimulierend oder supprimierend beeinflußt werden, wie es z.B. unter entsprechenden NaCl-Diäten der Fall ist. Dabei scheint es so zu sein, daß unter anderen auch über Alpha-Rezeptoren diese Einwirkung des SAS auf das Renin und CE vermittelt werden kann. Wie die vorliegenden Resultate weiter zeigen, kommt dem RAS unter gewissen Bedingungen unter anderem auch eine Bedeutung zu in der Regulation des Blutdrucks. Dabei fand sich eine Korrelation zum diastolischen Blutdruck nicht nur für das Renin, sondern auch für das im Plasma nachweisbare CE.

F. LITERATUR

1. Allen F.B., Gilmore J.P.: Influence of altering total body sodium on angiotensin I systemic converting activity
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 511-515 (1975)
2. Alexander J.C., Meyer J.H.: Comparison of Captopril with placebo in the treatment of essential hypertension
in: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors edited by Zola P. Horovitz
Urban & Schwarzenberg-Verlag, Baltimore-Munich 1981, 379-391
3. Alexandre J.M., Menard J., Chevillard C., Schmitt H.: Increased plasma renin activity induced in rats by physostigmine and effects of alpha- and beta-receptor blocking drugs
Eur. J. Pharmacol. 12: 127-131 (1970)
4. Assaykeen T.A., Clayton P.L., Goldfien A., Ganong W.F.: Effect of alpha- and beta-adrenergic blocking agents on the renin response to hypoglycemia and epinephrine in dogs
Endocrinology 87: 1318-1322 (1970)
5. Assaykeen T.A., Ganong W.F.: The sympathetic nervous system and renin secretion
Frontiers in Neuroendocrinology, 1971: 67-95
6. Atlas S.A., Sealey J.E., Laragh J.H.: "Acid"- and "Cryo"-activated inactive plasma renin
Circ. Res. 43 (Suppl I): II28-133 (1978)
7. Axelrod J., Tomchick R.: Enzymatic o-methylation of epinephrine and other catechols
J. biol. chem. 233: 702-705 (1958)
8. Barajas L., Latta H.: Structure of the juxtaglomerular apparatus
Circ. Res., Vol. XX, XXI (Suppl. II): II15-25 (1967)
9. Bigelow L.B., Dairman W., Weil-Malherbe H., Udenfried S.: Increased synthesis of catecholamines and their metabolites following the administration of phenoxybenzamine
Mol. Pharmacol. 5: 565-571 (1969)

10. Bing J., Poulsen K.: Time course of changes in plasma renin after blockade of the renin system: studies of conscious and anesthetized, normal, adrenalectomized and spontaneously hypertensive rats
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 83: 454 (1975)
11. Blair M.: Inhibition of renin secretion by intrarenal alpha-adrenoceptor blockade
Am. J. Physiol. 240: E682-688 (1981)
12. Blair M.: Stimulation of renin secretion by alpha-adrenoceptor agonists
Am. J. Physiol. 244: E37-44 (1983)
13. Bönner G., Helber A., Meurer K.A., Krause D., Hemmerich W., Lang R., Kusse M., Kaufmann W.: Verhalten von Blutdruck, Plasmanoreninkonzentration und Plasmanoradrenalin-konzentration unter Saralasin-Infusion bei unterschiedlichen Hypertonieformen
Therapiewoche 26: 7501 (1976)
14. Boucher R., Asselin J., Genest J.: A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II
Circ. Res. 34 (Suppl I): I203-209 (1974)
15. Brosnihan K.B., Ferrario C.M., Smeby R.R., Saavedra J.M.: Central and peripheral relationship between renin activity and sympathetic nervous system during sodium depletion in: *Central Nervous System, Mechanism in Hypertension* edited by Joseph P. Buckley and Carlos M. Ferrario
Raven Press, New York, 1981, 385-395
16. Brooks V.L.: An intracerebral, physiological role for angiotensin: effects of central blockade
Fed. Proc. 38: 2272-2275 (1979)
17. Brunner H., Chang P., Wallach R., Sealey J.E., Laragh J.H.: Angiotensin II vascular receptors: their avidity in relationship to sodium balance, the autonomic nervous system and hypertension
J. Clin. Invest. 51: 58-67 (1972)
18. Bunang R.D., Page I.H., McCubbin J.W.: Neural stimulation of release of renin
Circ. Res. Vol. XIX: 851-858 (1966)

19. Carey R.M., Vaughan E.D., Ackerly J.A., Peach M.J.,
Ayers C.R.: The immediate pressor effect of saralasin
in man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46: 36-43 (1978)
20. Carriere S., Cardinal J., Le Grimellec Ch.: Influence
of sodium intake on catecholamine release by angiotensin
and renal nerve stimulation in dogs
Can. J. Physiol. Pharmacol. 58: 1092-1101 (1980)
21. Carruba M.O., Picotti G.B., Miodini P., Lotz W.,
Da Prada M.: Blood sampling by chronic cannulation
technique for reliable measurements of catecholamines
and other hormones in plasma of conscious rats
J. Pharmacol. Methods 5: 293-303 (1981)
22. De Champlain J., Farley L., Cousineau D., Van Ameringen M.R.:
Circulating catecholamine levels in human and experi-
mental hypertension
Circ. Res. 38: 109-114 (1976)
23. Churchill P.C., Churchill M.C., McDonald F.D.: Renin
release in anesthetized rats
Kidney Int. 4: 273 (1973)
24. Cline W.H.: Role of released catecholamines in the vascular
response to injected angiotensin II in the dog
J. Pharmacol. Exp. Therap., Vol. 216: 104-110 (1981)
25. Dahlheim H., Gränger P., Thureau K.: A sensitive method
for determination of renin activity in the single juxta-
glomerular apparatus of the rat kidney
Pflügers Archiv, 321: 303-315 (1970)
26. Dahlheim H., Natcheff N.: Effect of kidney denervation
on cortical iso-converting enzyme activity in the rat
Pflügers Archiv, 393: 281-282 (1982)
27. Dahlheim H., Schweisfurth H.: Does cortical converting
enzyme (-like) activity influence renal renin release?
Evidence for a new cortical converting enzyme
Published 1981 by Elsevier North Holland, Inc. Sambhi, ed.

28. Dahlheim H., Schweisfurth H.: Does the kidney contain its own angiotensin I converting enzyme?
Pflugers Archiv 359 (Suppl.): 125 (1975)
29. Dahlheim H., Schweisfurth H.: Juxtaglomerular angiotensin II formation
Kidney Int. 22 (Suppl. 12): S49-54 (1982)
30. Davis J.O.: The controll of renin release
Am. J. Med. Vol. 55: 333-350 (1973)
31. Erdös E.G.: Angiotensin I converting enzyme
Circ. Res. Vol. 36: 247-255 (1975)
32. Erdös E.G.: Conversion of angiotensin I to angiotensin II
Am. J. Med. 60: 749-759 (1976)
33. Fagard R.H., Amery A.K., Lijnen P.J., Reybrouck T.M.:
Comparative study of an angiotensin II-analog and a
converting enzyme inhibitor
Kidney Int. Vol. 17: 647-653 (1980)
34. Forth W., Henschler D., Rummel W.: Allgemeine und spezielle
Pharamkologie und Toxikologie
B.I.-Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich 3. Auf-
lage (1980)
35. Ganten D., Lang R.E., Rascher W., Mann J.F.E., Unger Th.:
Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie, Neuere
Erkenntnisse
Münchn. med. Wschr. 123 (1981) Nr. 47, 1780-1784
36. Ganten D., Unger Th., Simon W., Schaz K., Schölkens B.,
Mann J.F.E., Speck G., Lang R., Rascher W.: Central
peptinergetic stimulation: focus on cardiovascular actions
of angiotensin and opioid peptides
in: Central nervous System, Mechanism in Hypertension
edited by J.P. Buckley and C.M. Ferrario, Raven Press,
New York: 265-281 (1981)
37. Gränger P., Dahlheim H., Thureau K.: Enzyme activities
of the single juxtaglomerular apparatus of the rat kidney
Kidney Int. 1: 78 (1972)

38. Graham R.M., Stephenson W.H., Pettinger W.A.: Pharmacological evidence for a functional role of the pre-junctional alpha-adrenoceptor in noradrenergic neurotransmission in the conscious rat
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311: 129-138 (1980)
39. Gross R., Schölmerich P.: Lehrbuch der Inneren Medizin
F.K. Schattauer- Verlag, Stuttgart-New York, 5. Auflage
S. 361 (1977)
40. Hata T., Ogiwara T., Mikami H., Nakamura M., Mandai T., Kumahara Y.: Effects of two angiotensin II analogues on blood pressure, plasma aldosterone concentration, plasma renin activity and creatinine clearance in normal subjects on different sodium intakes
Eur. J. Clin. Pharmacol. 18: 295-299 (1980)
41. Hatton R.B., Clough D., Faulkner K., Conway J.: Angiotensin converting enzyme inhibitor resets baroreceptor reflexes in conscious dogs
Hypertension 3: 676-681 (1981)
42. Hayduk R.B., Bock K.D.: Zentrale Blutdruckregulation durch Alpha₂-Rezeptorenstimulation
Clonidin-Workshop, Essen, 3.u.4. Dezember 1982.
Steinkopff Verlag Darmstadt, 9-19 (1983)
43. Heidland A., Krisch H.: Hypertonie, Aktuelle Erkenntnisse
Moderne Behandlung
Verlag Gerhard Witzstrock, Baden-Baden, Köln-New York
S. 9 (1980)
44. Hodge R.L., Lowe R.D., Vane J.R.: Role of the vagus nerve in the control of the concentration of angiotensin II in the circulation
Nature, Vol. 221, No. 5176: 177-179 (1969)
45. Borucki L.J., Levenson P., Hollenberg N.K.: Cardiovascular responses to blockade of angiotensin and alpha adrenergic receptors
Am.J. Physiol. 235 (3): F198-202 (1978)
46. Jaeger Ph., Ferguson R.K., Brunner H.R., Kirchertz B.J., Gavras H.: Mechanism of blood pressure reduction by teprotide (SQ 20881) in rats
Kidney Int. 13: 289-298 (1978)

47. Johnson J.A., Davis J.O., Wittley R.T.: Effects of catecholamines and renal nerve stimulation on renin release in the non-filtering kidney
Circ. Res. 29: 646 (1971)
48. Keeton K., Campbell W.B.: The pharmacologic alteration of renin release
Am. Soc. Pharm. Exp. Ther. Vol. 32, No.2: 81-156
49. Kopp U., Aurell M., Ablad B.: The role of prostaglandins in the alpha- and beta-adrenoceptor mediated renin release response to graded renal nerve stimulation
Pflügers Archiv, 391: 1-8 (1981)
50. Kopin I.J., Lake R.C., Ziegler M.: Plasma levels of norepinephrine
Ann. Int. Med. 89: 671-680 (1979)
51. Kvetnansky R., Sun C.L., Lake C.R., Torda T., Kopin I.J.: Effect of handling and forced immobilisation on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase
Endocrinology 103, 1868-1874 (1978)
52. Kurihara H., Gregory A., Dewailly Ph., Boucher R., Genest J.: Effects of changes in sodium balance and of experimental renal hypertension on plasma angiotensin I converting enzyme activity of rabbits
Tohoku J Exp. Med. 109: 19-27 (1973)
53. Langer S.Z., Massingham R., Shepperson N.B.: Alpha₁- and alpha₂-receptor subtypes: relevance to antihypertensive therapy
in: Central nervous System, Mechanism in Hypertension edited by J.P. Buckley and C.M. Ferrario, Raven Press, New York, 161-163 (1981)
54. Langer S.Z.: Presynaptic regulation of the release of catecholamines
Pharm. Rev. Vol. 32, No. 4: 337-356 (1981)

55. Liebau G., Beyer J., Larbig D., Schik K., Sekanina G., Kayduk K.: Hämodynamische Veränderungen nach Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems durch Saralasin
Klin. Wschr. 55: 647-649 (1977)
56. Mancina G., Romero J.C., Shepard J.T.: Continuous inhibition of renin release in dogs by vagally innervated receptors in the cardiopulmonary region
Circ. Res. Vol. 36: 529-535 (1975)
57. Mc Grath B.P., Ledingham J.G.G., Benedict C.R.: Plasma catecholamines and the pressor response to Sar¹-Ala⁸-angiotensin II in man
Clin. Sci. Mol. Med. 53, 341-348 (1977)
58. Merrill J.E., Peach M.J., Gilmore J.P.: Angiotensin I conversion in the kidney and its modulation by sodium balance
Am.J. Physiol. Vol. 224, No.5, 1104-1108 (1973)
59. Meurer K.A.: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Kurzmonographien Sandoz
60. Meurer K.A. Die Bedeutung des sympathico-adrenalen Systems für die Reninfreisetzung
Klin. Wschr.49, 1001-1014 (1971)
61. Meyer D.K. Kempter A., Boll M., Eisenreich M., Hertting G.: Alpha-adrenoceptor-mediated inhibitory effect of the sympathetic nervous system on the isoprenaline-induced increase in plasma renin concentration
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 299, 77-82 (1977)
62. Molteni A., Mullis K.B., Fakheim R.M., Mattioli L.: The effect of changes in dietary sodium on lung and serum angiotensin-I-converting enzyme in the rat
Laboratory Investigation Vol. 35, No. 6, 569-572 (1976)
63. Nakane H., Nakane Y., Corvol P., Menard J.: Sodium balance and renin regulation in rats: role of intrinsic renal mechanism
Kidney Int. Vol 17, 607-614 (1980)

64. Nishimura T., Nishio I., Ontani H., Jimbo S., Kuchii M., Masuyama Y.: Plasma catecholamines determination using high pressure liquid chromatography and their roles in blood pressure regulation and experimental hypertension in rats
Jap. Circ. J. Vol. 43, No 9, 855-866, (1979)
65. Page J.H.: Letter to the editor: Angiotensin and hypertension
J.Amer. med. Assoc. 243, 1631 (1980)
66. Palazzoadriano M., Albano V., Bellanca L., Latteri S., Valdes L., Mangiameli S.: Modifications induced in the renin-angiotensin-aldosterone system of the rats by alpha-blocking drugs
Pharmacol. Res. Comm. Vol. 10, No. 10, 925-936 (1978)
67. Passo S.S., Assaykeen T.A., Otuska K., Wise B.L., Goldfien A., Ganong W.F.: Effect of stimulation of the medulla oblongata on renin secretion in dogs
Neuroendocrinology 7: 1, (1971)
68. Passo S.S., Assaykeen T.A., Goldfien A., Ganong W.F.: Effect of alpha- and beta- adrenergic blocking agents on the increase in renin secretion produced by stimulation of the medulla oblongata in dogs
Neuroendocrinology 7: 97-104 (1971)
69. Peach M.J.: Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanism of action
Phys. Rev. Vol. 57, No. 2, 313-370 (1977)
70. Pettinger W.A., Tanaka K., Keeton K., Campbell W.B., Brooks S.N.: Renin release, an artifact of anesthesia and its implications in rats
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 148, 625 (1975)
71. Phillips M.I., Weyhenmeyer J., Felix D., Ganten D., Hoffman W.E.: Evidence for an endogenous brain renin-angiotensin system
Fed. Proc. 38, 2260-2299 (1979)

72. Phillips M.I., Hoffman W.E., Felix D., Ganten D.: Nachweis von Angiotensinrezeptoren im Gehirn
Therapiewoche 25, 46, S.7548 (1974)
73. Piquilloid Y., Reinharz A., Roth M.: Studies of the angiotensin converting enzyme with different substrates
Biochem. Biophys. Acta 206, 136-142 (1970)
74. Ploth D.W., Navar G.: Intrarenal effects of the renin-angiotensin system
Fed. Proc. 38, 2280-2285 (1979)
75. Da Prada M., Zürcher G.: Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline and dopamine within the pentomole range
Life Sciences Vol. 19, 1161-1174 (1976)
76. Printz M.P. Gregory T.J.: Brain angiotensinogen: Evidence for an independent and functional central angiotensin system in . Central Nervous System Mechanisms in Hypertension edited by J.P. Buckley and C.M. Ferrario, Raven Press New York: 311-325 (1981)
77. Reid I.A.: The brain-renin-angiotensin-system: a critical analysis
Fed. Proc. 38: 2255-3259 (1979)
78. Richter: Verhalten der Renin- und Angiotensin I-Converting enzyme-Aktivitäten im Serum und Nierengewebe der Ratte unter Kontrollbedingungen und nach Katecholaminapplikation
Inaugural-Dissertation, Med. Fak. München (1985)
79. Röckel A., Appel E., Palm D., Müller G., Hennemann H., Heidland A.: Plasmakatecholamine und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System unter Angiotensin II-Blockade (Sar-1-Ala-8-angiotensin II)
Therapiewoche 26: 7589 (1976)
80. Sarenin, direkter Angiotensin II-Antagonist zur Hochdruckdiagnostik
Röhm Pharma GMBH, Weiterstadt

81. Rowe B.P., Nasjletti A.: The effect of angiotensin II-infusion on plasma catecholamines in the conscious rabbit
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68: 110-113 (1981)
82. Salama S.: Vergleichende Untersuchungen über das Renin-Angiotensin-System im Plasma und in mikrodisssezierten Glomeruli der Ratte
Inauguraldissertation, Med. Fak. LMU München (1980)
83. Samwer K.F., Schreiber M.: Pressor effect of angiotensin II in sodium replete and deplete rats
Pflügers Archiv 346: 307-313 (1974)
84. Schweisfurth H.: Lokalisation, Charakterisierung und physiologisches Verhalten des Angiotensin I-Converting enzyme
Inauguraldissertation, Med. Fak. LMU München (1975)
85. Siegenthaler W.: Klinische Pathophysiologie
G. Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage: S. 649 (1979)
86. Thurau K., Dahlheim H., Granger P.: On the lokal formation of angiotensin at the site if the juxtaglomerular apparatus
Proc. 4th Intern. Congr. Nephrol., Stockholm, Vol. 2: 24-30, Karger, Basel (1970)
87. Thurau K., Dahlheim H., Grüner A.: Activation of renin in the single juxtaglomerular apparatus by sodium chloride in the tubular fluid at the macula densa
Circ. Res. 31-32 (Suppl. II): II182-186, (1972)
88. Thurau K., Schnermann J.: Die Natriumkonzentration an den Macula Densa-Zellen als regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat
Klin. Wschr. 43: 410-413 (1965)
89. Tigerstedt R., Bergman P.G.: Niere und Kreislauf
Skand. Arch. Physiolog. 8: 223-271 (1898)
90. Tobian L.: Relationship of juxtaglomerular apparatus to renin and angiotensin
Circ. 25: 189-192 (1962)

91. Unger T., Rockhold R.W., Kaufmann-Bühler I., Hübner D., Schüll B., Speck C., Ganten D.: Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on the brain
in: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, Mechanism of Action and clinical Implications
edited by Zola P. Horovitz, Urban & Schwarzenberg- Verlag
Baltimore-Munich: 55-79 (1981)
92. Vander A.J.: Control of renin release
Physiol. Rev. 47: 359-381 (1967)
93. Vander A.J.: Effect of catecholamines and renal nerves
on renin secretion in anaesthetized dogs
Am. J. Physiol. 209 (3): 659-662 (1965)
94. Vandongen R., Peart St.W., Boyd Gr. W.: Adrenergic
stimulation of renin secretion in the isolated perfused
rat kidney
Circ. Res. Vol. 32: 290-296 (1973)
95. Vandongen R., Peart St. W.: The inhibition of renin
secretion by alpha-adrenergic stimulation in the isolated
rat kidney
Clin. Science Mol. Med. 47: 471-479 (1974)
96. Vandongen R., Strang K.D., Poesse M.H., Birkenhäger W.H.:
Suppression of renin secretion in the rat kidney by a
nonvascular alpha-adrenergic mechanism
Circ. Res. 45, No. 4: 435-439 (1979)
97. Vlachakis N.D., Ribeiro A.B., Krakoff C.R.: Effect of
saralasin upon plasma catecholamines in hypertensive
patients
Amer. Heart J. 95: 78-80 (1978)
98. Wambach G., Kaufmann W.: Behandlung der hypertensiven
Krise durch Blockade des Renin-Angiotensin-Systems
Münch. Med. Wschr. 124, Nr. 27: 638/40-640/40 (1982)
99. Winer N., Choksi D.S., Wallenhorst W.G.: Effects of
cyclic AMP, sympathomimetic amines, and adrenergic
receptor agonists on renin secretion
Circ. Res. 29: 239-249 (1971)

100. Zanchetti A., Stella A.: Renin and the sympathetic nervous system
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., J.F. Bergmann Verlag, München: 129-139 (1974)
101. Zanchetti A., Stella A., Dampney R.: Central and reflex control of renin release
in: Hypertension and Brain Mechanism, Progress in Brain Research, Vol. 47, Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam: 397-407
102. Zehr J.E., Feigl E.O.: Suppression of renin activity by hypothalamic stimulation
Circ. Res. Vol. 32, 33 (Suppl. I): 117-27 (1973)
103. Zimmermann B.G., Kraft B.: Blockade by saralasin of adrenergic potentiation induced by renin-angiotensin system
J. Pharmacol. Exp. Ther. 210: 101-105 (1979)
104. Brosnihan B.K., Szilagyi J.E., Ferrario C.M.: Effect of chronic sodium depletion on cerebrospinal fluid and plasma catecholamines
Hypertension 3: 233-239 (1981)
105. Clough D.P., Hatton R., Conway J.: A functional role for angiotensin II in the control of cardiovascular reflexes
in: Central nervous System, Mechanism in Hypertension edited by J.P. Buckley and C.M. Ferrario, Raven Press New York, 377-384 (1981)
106. Freeman R.H., Davis J.O.: Physiological actions of angiotensin II on the kidney
Fed. Proc. 38: 2276-2279 (1979)

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Dahlheim für die Überlassung des Themas, für sein stetes Interesse und seine hilfreiche Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich bei seinen Mitarbeitern, die mich mit den technischen Möglichkeiten des Labors vertraut gemacht haben.

Mein Dank gilt ferner der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Firma Rhöm Pharma, Darmstadt und der Firma Guillini Pharma, Hannover für ihre Unterstützung.

Außerdem danke ich meiner Frau für ihr aufgeschlossenes Verständnis und ihre Mithilfe beim Schreiben der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 12. April 1956 wurde ich als Sohn des Maurers Johann Woidy und seiner Frau Leopoldine, ge. Schaufler, in Ergoldsbach geboren. Nach Besuch der Grundschule in Ergoldsbach trat ich 1967 in das humanistische Hans-Carossa-Gymnasium in Landshut über. 1976 legte ich dort das Abitur ab. Anschließend absolvierte ich meinen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr in der Sanitätstruppe.

Ab dem Wintersemester 1977/78 studierte ich an der Ludwig-Maximilian-Universität in München Medizin. Gemäß der Approbationsordnung für Ärzte habe ich im August 1979 das Physikum, 1980 den ersten, 1982 den zweiten und 1983 den dritten Teil des Staatsexamens abgelegt. Im November 1983 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Im Januar 1980 begann ich an dem physiologischen Institut der Universität München bei Herrn Prof. Dr. Dahlheim mit dem wissenschaftlichen Teil meiner Arbeit. Ich beschäftigte mich auf dem Gebiet des Renin-Angiotensin-Systems vornehmlich mit der Bestimmung des Renins und Converting-enzymes. Die experimentellen Untersuchungen wurden Ende 1982 abgeschlossen.

Seit November 1983 arbeite ich als Assistenzarzt an der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Mallersdorf.

